

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**Evaluación del riesgo por toxicidad crónica a la  
exposición de magnesio a nivel renal en ratas de la  
especie *Rattus norvegicus***

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

**AUTOR**

Giancarlo Méndez Agreda

**ASESORES**

Mesías Moisés García Ortiz

Francisco Javier Ramírez Cruz

Lima - Perú

2013

*A Dios, pues a pesar de todas las adversidades  
pasadas, es la luz y guía para poder continuar.  
Inclusive a pesar de sentir que no tenía fuerza,  
sin explicación alguna hallé la fortaleza  
y determinación para salir adelante.*

*A mi madre, por su apoyo incondicional  
y total entrega. Pero por sobre todo por  
enseñarme a ver que puedo lograr lo  
que me propongo si realmente le entrego  
el corazón.*

*A mi abuela, pues por ella fue  
que se sembraron los valores que hasta  
hoy en día conducen mi accionar y forma  
de ser.*

*A mis mentores que formaron mi mente  
y espíritu, pero más allá de todo eso  
por introducir en mí la incommensurable  
pasión por las ciencias.*

*Y a todos aquellos que de un modo  
directo o indirecto, me ayudaron a desarrollar  
éste trabajo, que por más pequeña que haya  
sido su colaboración, este trabajo no hubiera  
sido posible.*

*Agradezco también mi asesor Dr. Mesías  
Moisés García Ortiz y co-asesor Mg. Francisco  
Javier Ramírez Cruz por brindarme sus comentarios,  
sugerencias, experiencias y continuo apoyo a lo  
largo de la realización del presente trabajo.*

*Especial agradecimiento a los miembros del  
Jurado Examinador y Evaluador por sus aportes  
y sugerencias:*

*Q.F. Jesús Víctor Lizano Gutiérrez  
Mg. José Alfonso Apesteguía Infantes  
Q.F. Fritz Fedor Choquesillo Peña  
Q. F. María Rosario Carreño Quispe.*

*Así como también mencionar a la Dra. Rosa  
Perales Camacho quien me brindó su apoyo con  
los estudios histopatológicos y agradecimiento a la  
facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.*

*Pero por sobre todo para que se continúen  
realizando trabajos multidisciplinarios y nos demos  
la mutuamente la mano los distintos profesionales  
en la investigación de la salud.*

## INDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	
<b>RESUMEN</b>	
<b>SUMMARY</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>8</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
<b>I. GENERALIDADES</b>	<b>9</b>
1.1 Antecedentes	9
1.2 Magnesio	11
1.3 Toxocinética del Magnesio	12
1.4 Toxodinamia del Magnesio	14
1.5 Intoxicación por Magnesio	25
1.6 Tratamiento	26
1.7 Suplementos nutricionales	26
<b>II. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>29</b>
2.1 Muestra de estudio	29
2.2 Materiales, Reactivos y Equipos	29
2.3 Descripción del Método	31
2.4 Técnica Operatoria	36
<b>III. RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	<b>68</b>
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>73</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES</b>	<b>75</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>76</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	<b>80</b>

## **ABREVIATURAS**

**OECD** : Organism for Economic Co-operation and Development (Organismo para la Cooperación Económica y el Desarrollo)

**IDA** : Ingesta Diaria Admisible

**DL<sub>50</sub>** : Dosis Letal 50

**NOAEL** : No observed adverse effect levels (Niveles de no observación de efectos adversos)

**IOM** : Institute of Medicine

## RESUMEN

Se realizó un estudio histológico a nivel renal, específicamente en la corteza medular renal y la rama gruesa ascendente del asa de Henle, en un grupo de 36 ratas albinas de la especie *Rattus norvegicus* cepa Holtzman, a las cuales se les administró cloruro de magnesio vía oral Ad libitum. Se cuantificaron los niveles de urea, creatinina, ácido úrico y proteínas totales en sangre, y examen completo de orina.

El estudio histológico de los riñones reveló daño celular sub letal para los grupos Dosis 1 (D1, 600 mg de Magnesio/día) y Dosis 2 (D2, 1200 mg de Magnesio/día) tanto en machos como en hembras evidenciándose una leve tumefacción que abarcó zona medular y cortical en comparación con el grupo Blanco. Los parámetros bioquímicos como la urea con 46.86 mg/dL de plasma fueron encontrados para la dosis 1 y dosis 2, y la creatinina con 1.80 mg/dL de suero y 1.52 mg/dL de suero, respectivamente, se encontraron elevados. Con respecto al ácido úrico, ninguno de los valores encontrados en los grupos estudiados superó los límites permitidos. Mientras que las proteínas totales están disminuidos (dosis 1 con 4.24g/dL; dosis 2 con 5.14 g/dL).

Lo que conlleva a decir que el consumo de cloruro de magnesio a las concentraciones descritas, durante el periodo estudiado, generó daño funcional y estructural a nivel renal.

**Palabras Clave:** Magnesio, corteza medular renal, asa de Henle, ratas.

## SUMMARY

Histological examination was performed on renal level, specifically in the renal cortex and medullary thick ascending limb of Henle's loop, a group of 60 albino rats of the species *Rattus norvegicus* Holtzman strain, to which was administered Magnesium Chloride orally Ad libitum. We quantified the levels of urea, creatinine, uric acid and total protein in blood, and urine complete examination.

Histological examination of the kidneys revealed cellular damage sublethal for groups dose 1 (D1, Magnesium 600 mg / day) and dose 2 (D2, Magnesium 1200 mg / day) in both males and females evidenced by a slight swelling covering medulla and cortical compared with the white group. Biochemical parameters as urea with 46.86 mg / L of plasma were found to dose 1 and dose 2, and creatinine with 1.80 mg / dL of serum and 1.52 mg / dL of serum, respectively, was elevated. With respect to uric acid, none of the values found in the study groups exceeded allowable limits. While the total proteins are decreased (dose 1 with 4.24g/dL; doses 2 to 5.14 g / dL).

Leading to say that consumption of magnesium chloride at the concentrations described, during the period of study, generated structural and functional damage to the kidney.

**Keywords:** Magnesium, renal medullary cortex, loop of Henle, rats.

## INTRODUCCIÓN

El magnesio es uno de los oligoelementos más importantes para los seres vivos, pues se halla involucrado en numerosas reacciones bioquímicas de vital importancia. Ayuda a mantener el tono normal del músculo y la función nerviosa, mantiene el ritmo del corazón, compatible con un sistema inmunológico saludable y mantiene los huesos fuertes. El magnesio también ayuda a regular el azúcar en la sangre, promueve la presión arterial normal y es conocido por estar involucrado en el metabolismo de la energía y la síntesis de proteínas. Debido a todas estas propiedades que ejerce sobre el organismo, el magnesio ha tenido un importante reconocimiento. A su vez, su comercialización, como suplemento mineral e incluso como producto terapéutico, se ha incrementado en los últimos años en nuestro país. No obstante, las sales de magnesio son comercializadas como OTC por su categoría de suplemento mineral, por lo que no hay un adecuado control con respecto al consumo y seguimiento a la dosis que debe consumir cada paciente. Ello contribuye a un consumo desmesurado de este ión y que a la larga pueda conllevar a procesos crónicos adversos para la salud.

En nuestro país existen muchos trabajos que demuestran las propiedades benéficas que posee el magnesio. Pero, no hay muchos trabajos de investigación referentes al consumo excesivo de magnesio o a los daños que el magnesio puede ejercer si es consumido en dosis altas. Por esto, es importante determinar si el consumo prolongado de magnesio en dosis que se encuentren por debajo de los niveles tóxicos pero superiores a la dosis recomendada por organismos como el IOM de EE. UU. produce algún tipo de daño y a qué nivel se evidencia el daño.

El presente trabajo fue realizado en 36 ratas (18 machos y 18 hembras) de la especie *Rattus norvegicus* siguiéndose los lineamientos proporcionados por la OECD; se realizaron estudios de tipo histológico para evaluar el estado renal de los animales, así como también se evaluaron parámetros bioquímicos como concentración de urea, creatinina, ácido úrico y proteínas totales en sangre, y un examen general de orina.



## **HIPÓTESIS**

- El consumo de magnesio por encima de la ingesta diaria admisible (IDA) en la población expuesta, genera toxicidad en el sistema renal.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el daño renal producido por el consumo crónico de magnesio en ratas de la especie *Rattus norvegicus*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la concentración de urea.
- Determinar la concentración de creatinina.
- Determinar la concentración de ácido úrico.
- Determinar la concentración de proteínas totales.
- Evaluar la histología renal (asa de Henle y corteza medular renal).
- Demostrar que un consumo crónico de magnesio por encima de la ingesta diaria admisible afecta a la homeostasis.

## **I. GENERALIDADES**

### **1.1 ANTECEDENTES**

En el Perú, se han realizado estudios sobre magnesemia en humanos en relación a trastornos renales y alteración del metabolismo de este metal en presencia de insuficiencia renal. Tal es así que en 1961, Salcedo La Torre, desarrolló una tesis sobre magnesemia en nefropatías en la facultad de Farmacia y Bioquímica, siendo ésta una de las investigaciones más antiguas y puntuales en lo que se refiere al tema <sup>(1)</sup>.

En el 2001, en la Facultad de Odontología de la UNMSM, el Mg. Cirujano Dentista Justiniano Sotomayor realizó estudios toxicológicos experimentales en ratas demostrando la toxicidad del hexafluorosilicato de magnesio, demostrándose mediante estudios histológicos a nivel hepático y mucosa gástrica, congestiónamiento vascular e infiltración leucocitaria <sup>(2)</sup>.

En el 2002, el Dr. Wagner reunió los resultados de distintas investigaciones escribiendo un artículo, en el cual se explica el comportamiento del magnesio a nivel renal y su relación con la regulación de la presión arterial <sup>(3)</sup>.

En el 2003, Balbuena Oré, estudió la acción del sulfato de magnesio sobre el inicio de acción y vida media del Rocuronio en pacientes intervenidos con anestesia general en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza, que evidenció que el sulfato de magnesio prolonga la acción del Rocuronio mejorando el efecto de bloqueo neuromuscular<sup>(4)</sup>.

En el 2005, se realizó un estudio sobre eclampsia en pacientes diagnosticadas con preeclampsia severa que recibieron sulfato de magnesio como tratamiento en el Hospital San Bartolomé, demostrándose la efectividad e inocuidad de este tratamiento <sup>(5)</sup>.

A nivel internacional, los estudios sobre trastornos del metabolismo del magnesio datan desde los años cincuenta. En 1958, en EEUU, se estudiaron los efectos de la privación de magnesio sobre la función renal, determinando que la zona de afección en las magnesemias son las células del túbulo <sup>(6)</sup>.

Un año más tarde Hess y Mc Yntire, en Inglaterra, estudiarían los cambios histoquímicos producidos por la privación de magnesio en riñones de ratas, las cuales desencadenan en problemas de nefrosis y fibrosis renal<sup>(7)</sup>.

En 1985, Quamme realiza estudios de metabolismo de magnesio en humanos a nivel de células renales<sup>(8)</sup>. En 1990, empleando células de origen renal en cultivo, determinaron la actividad intracelular del  $Mg^{++}$  con la ayuda de una sonda fluorescente. Reportaron valores cercanos a 0,5 mM, que son del orden de los generalmente determinados en otros tipos celulares, de origen epitelial o no. El magnesio libre sólo representa del 1 al 3% del magnesio total. La mayor parte de este elemento se haya ligado a compuestos tanto orgánicos como inorgánicos<sup>(9)</sup>.

En 1991, se detectó que los efectos de un cierto número de hormonas o agonistas (PTH, calcitonina, glucagon, arginina-vasopresina, isoproterenol, insulina) sobre el transporte de los iones mono y divalentes han sido estudiados in vivo en el asa de Henle de la rata e in vitro sobre los segmentos corticales o medulares de la rama ascendente ancha de ratón o de conejo. Brevemente, todos estos agentes estimulan estos transportes en el asa de la rata, ejerciendo sin embargo, efectos diferentes en ambos segmentos. En los roedores (rata, ratón) es posible concluir que estos agentes estimulan el transporte de magnesio y de calcio sólo a nivel del segmento cortical y estimulan, así mismo, el transporte de NaCl en ambos segmentos (salvo la PTH, en ambas especies, y la calcitonina, en el ratón, que sólo actúa sobre el segmento cortical)<sup>(10)</sup>.

En 1993, a consecuencia de los trabajos de Brown y su equipo, diversos estudios han revelado la presencia, en la membrana plasmática o en el citoplasma de las células-blancas, de receptores sensibles a los solutos extracelulares que desempeñarían un rol, al igual que las hormonas, de primeros mensajeros<sup>(11)</sup>. En el mismo año se realizan estudios sobre el transporte de magnesio a nivel celular y la dinámica electrolítica del mismo.<sup>(12)</sup>

En 1996, se determinó que en la rata el flujo neto de resorción es muy limitado a nivel de la porción medular, aun si, mediante un artificio experimental, se aumenta la diferencia de potencial transepitelial, haciéndola pasar, por ejemplo, de +8mV, valor habitual para segmentos pre fundidos

in vitro, a un valor del orden de +20mV. En síntesis, no se ha visto nunca resorción neta alguna de magnesio, sea cual sea la diferencia de potencial. Curiosamente, por el contrario, se ha visto que en condiciones en que el flujo neto de resorción de NaCl es nulo, se afecta el comportamiento de los iones divalentes ( $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ ), ello a nivel del asa de Henle. <sup>(13)</sup>

Finalmente, el estudio más resaltante que cabe mencionar fue realizado en Cuba y publicado en 2002 en la Revista Toxicológica de España en el cual se demostró la toxicidad subcrónica del “Calcidol” un suplemento nutricional que contiene Calcio y Magnesio, en el cual se observó una hiperplasia fisiológica de la glándula tiroides, aumento del pH urinario y alteraciones histopatológicas de los riñones de tipo nefrítico y nefrótico. <sup>(14)</sup>

## **1.2 MAGNESIO**

Es un elemento relativamente abundante desde el punto de vista químico, su nombre proviene del griego Magnesia (antigua localidad de Tesalia). El magnesio es, por su abundancia, el octavo elemento más abundante de la corteza terrestre. Se encuentra en los depósitos de salmuera y de sal, como  $\text{MgCl}_2$  y como sal doble  $\text{MgCl}_2 \cdot \text{KCl}$ , carnalita. La dolomita, formada principalmente de sal doble  $\text{MgCO}_3 \cdot \text{CaCO}_3$ , está distribuida ampliamente, formando montañas enteras.

En el mar hay reservas ilimitadas de magnesio. Cada tonelada de agua contiene el equivalente a 12 Kg de  $\text{MgCl}_2$ , y actualmente, es la fuente comercial más importante del magnesio, primer metal obtenido del mar. <sup>(15)</sup>

### **1.2.1 CLORURO DE MAGNESIO**

Se puede hallar en estado hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) o en estado anhidro ( $\text{MgCl}_2$ ). Se obtiene tratando magnesita ( $\text{MgCO}_3$ ) u otros minerales de magnesio adecuados con ácido clorhídrico (HCl). Ésta sal al microscopio se observa como copos o cristales delicuescentes, inodoros, incoloros, que pierden agua cuando se calientan a 100° C y pierden HCl cuando se calientan a 110 °C; pH (solución 1 en 20 de agua libre de  $\text{CO}_2$ ) 4,5 a 7. Muy soluble en agua y completamente soluble en alcohol. <sup>(16)</sup>

### 1.2.2 USOS

Se emplea ésta sal para reponer electrolitos, como componente principal en soluciones para diálisis peritoneal y hemodiálisis. Además, de que bajo esta forma los iones magnesio son mucho más biodisponibles, se le emplea como un bloqueante natural de los canales de calcio para el tratamiento de numerosas enfermedades cardiovasculares, aunque también se emplea la sal como sulfato.<sup>(16)</sup>

## 1.3 TOXICOCINÉTICA DEL MAGNESIO

### 1.3.1 ABSORCIÓN

El 90% del magnesio ingerido se absorbe a nivel del intestino delgado (principalmente duodeno), el resto tanto en el estómago como en el intestino grueso. Actualmente, se admite la existencia de dos sistemas de transporte intestinal para el catión, uno mediado por transportador y saturable a bajas concentraciones (2-4 mEq/L), y otro por difusión simple que se da a altas concentraciones. Diversos estudios a nivel metabólico manifiestan que a condiciones normales el Magnesio se absorbe en una proporción que oscila entre 45 – 70%. Actualmente no se ha podido demostrar la influencia de la vitamina D sobre la absorción del Magnesio, ya que los estudios que existen muestran resultados contradictorios. Los iones fosfato, citrato, el calcio, los ácidos grasos, el ácido fítico y las sales biliares disminuyen la absorción ya que forman compuestos insolubles con el Magnesio. Una deficiencia en vitamina B1 y B6 produce un descenso del transporte intestinal del catión. Otro factor muy importante es el equilibrio ácido - base, pues en los casos de acidosis metabólica, la absorción de Magnesio aumenta.<sup>(17)</sup>

### 1.3.2 DISTRIBUCIÓN

Una vez absorbido, el ión es transportado a los distintos tejidos, siendo el óseo donde se halla en mayor proporción. El Magnesio óseo se encuentra localizado en los cristales de apatita, al menos en dos formas químicas  $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F},\text{OH})]$  siendo el hidróxido (OH) la forma soluble. Un 20-

30% del Magnesio en la superficie de los cristales es fácilmente intercambiable y modificado por los niveles séricos, existiendo un equilibrio debido a influencias fisicoquímicas más que enzimáticas. El resto se encuentra íntimamente incorporado y no es intercambiable. El Magnesio muscular da un índice más real de la cantidad de catión que existe en el organismo ya que es fácilmente modificable a efectos homeostáticos<sup>(17)</sup>.

### **1.3.3 METABOLISMO Y EXCRECIÓN**

Debido a que el ión magnesio y las sales que forma son solubles no requieren de un tratamiento metabólico para eliminarlo. La vía más importante de excreción es la digestiva, con variaciones según el tipo de ingesta: así, si la dieta es muy rica en magnesio las pérdidas en heces pueden llegar a un 75%, mientras que con dietas pobres estas pérdidas se reducen a un 30%. Las pérdidas endógenas son, como en la mayoría de los minerales, muy difíciles de cuantificar, aunque se sabe que hay pérdidas a través de la bilis, jugo intestinal y pancreático.

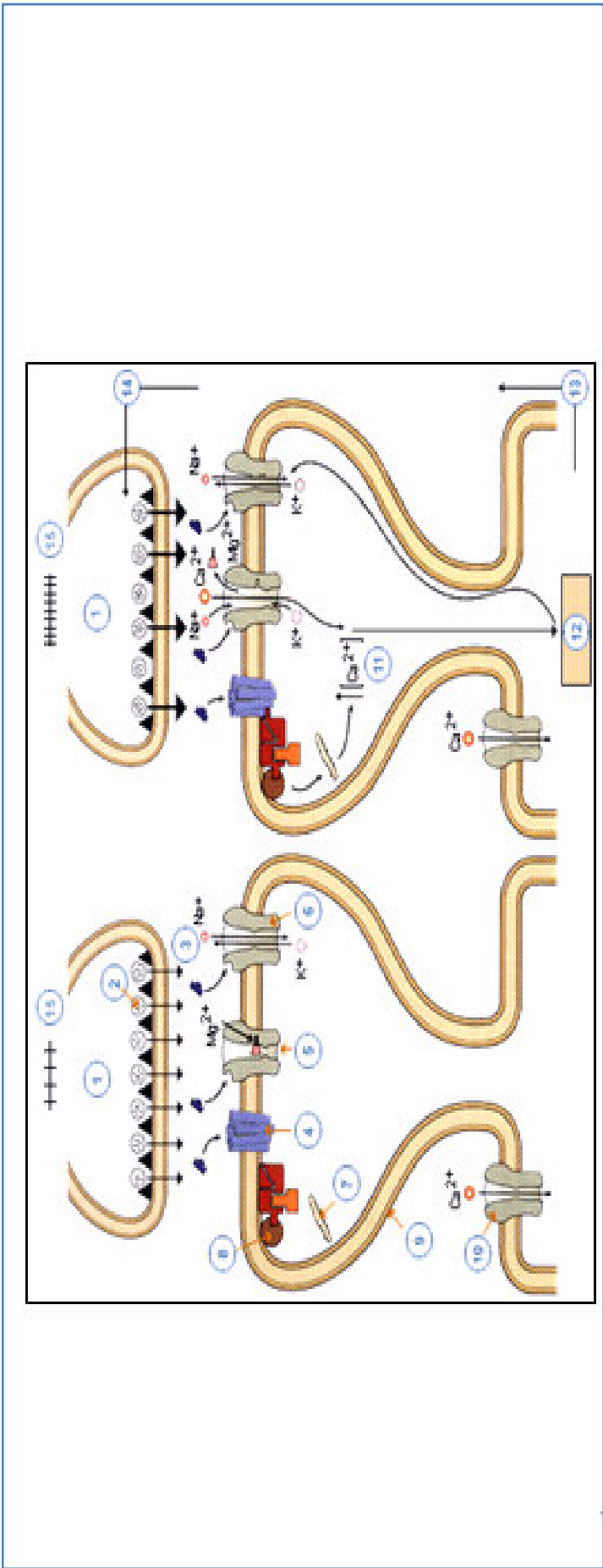
La tercera parte del magnesio que entra en el organismo por la dieta, se excreta por la orina, la cantidad excretada por esta vía es mínima cuando la ingesta es deficitaria y se estabiliza cuando los aportes son superiores a los normales. Por todo ello, se considera que el riñón es el órgano fundamental en la homeostasis del catión. Del 95-97% del magnesio filtrado es reabsorbido y sólo de un 3-5% es excretado. Entre un 20- 30% es reabsorbido en el túbulo proximal, siendo en el tramo ascendente del asa de Henle donde se produce la mayor reabsorción (en este segmento se reabsorbe del 50-60%).

Hay numerosas hormonas que influyen de un modo directo o indirecto sobre la excreción renal. La parathormona y calcitonina aumentan su reabsorción tubular. La hormona del crecimiento, la antidiurética, las suprarrenales, andrógenos y estrógenos aumentan la excreción urinaria. Igualmente la eliminación renal está aumentada por otras sustancias como la glucosa, galactosa, etanol, etc.<sup>(17)</sup>

#### 1.4 TOXICODINAMIA DEL MAGNESIO

El cloruro de magnesio es considerado de baja toxicidad y no peligroso para la salud. La ingesta de grandes cantidades de sales de magnesio, generan irritación gastrointestinal y una acción catártica. A nivel sistémico el magnesio difunde de manera completamente independiente a través de las membranas y se deposita en distintos tejidos. Su acción principal es directamente a nivel del sistema nervioso a través de los canales de calcio.<sup>(18)</sup> La vía más importante para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células excitables (Células musculares, neuronas y células de glándulas neuroendocrinas) son los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltajes dependientes. Al abrirse, permiten el flujo selectivo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a través del poro del canal, iniciándose una variedad de procesos intracelulares entre los que se incluyen la contracción muscular, la secreción de neurotransmisores, la expresión génica, la modulación de la excitabilidad de la membrana, el crecimiento de neuritas (expansiones del soma neuronal como dendritas o axón), etc. De esta forma, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  constituyen el enlace fundamental entre las señales eléctricas de la superficie de la membrana y las respuestas bioquímicas intracelulares.<sup>(19)</sup>

El terminal presináptico tiene una gran abundancia de canales de calcio dependientes, cuando se despolariza estos canales se abren y permiten la entrada en el terminal de un número importante de iones Calcio. Lo que conlleva a una apertura de hendidura sináptica lo que conlleva a la liberación de neurotransmisor (generalmente son neurotransmisores excitatorios glutamato y aspartato), por lo tanto la cantidad de neurotransmisor liberado es proporcional al total de iones calcio que ingresan al canal. Una vez que se libera el neurotransmisor la alta concentración de calcio en la neurona hace que se polarice, y migren estos iones hacia la zona postsináptica cargada negativamente. En la neurona postsináptica, el neurotransmisor se une a su receptor (generalmente tipo NMDA excitatorio) y abre los canales de sodio y calcio y estos nuevamente se ubican en el extra celular despolarizando la neurona, tal como se aprecia en el “Esquema 1”<sup>(20, 21)</sup>. El ión magnesio bloquea al receptor del neurotransmisor, por lo que bloquea de un modo indirecto a los canales de calcio. Al ser inhibidos se inhibe también el potencial de acción y se da una relajación nerviosa.<sup>(21)</sup>

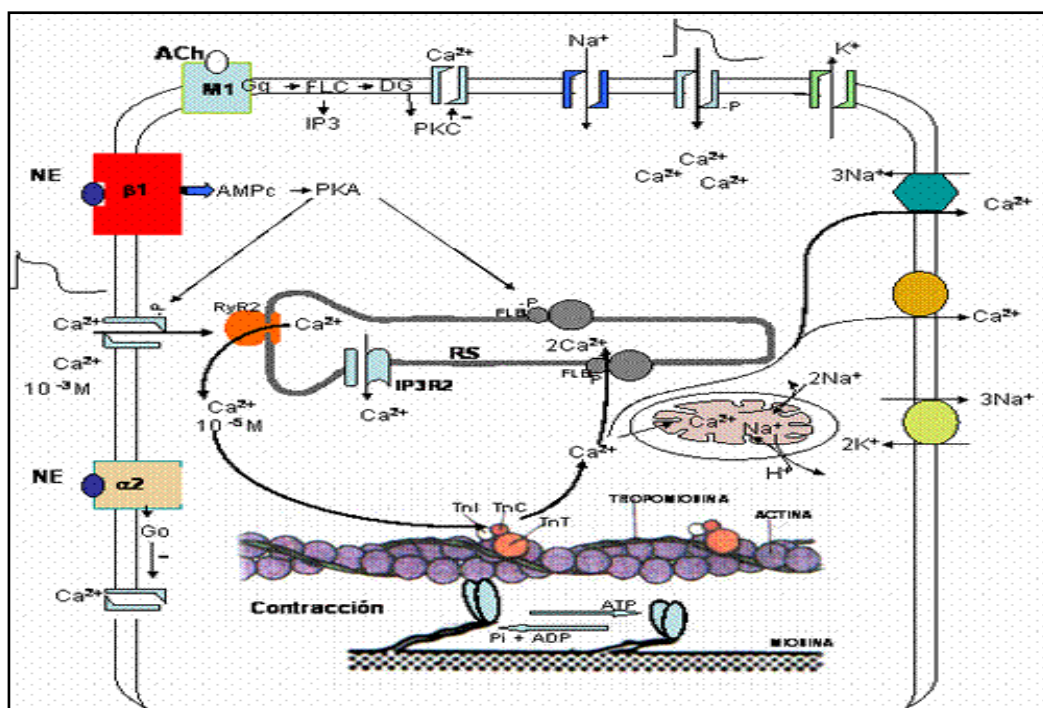


ESQUEMA 1. MOVIMIENTO DE LOS IONES CALCIO Y MAGNESIO EN LA SINÁPSIS QUÍMICA

<p>1. Parte presináptica</p> <p>2. Vesículas glutamatérgicas</p> <p>3. Moléculas del neurotransmisor glutamato</p> <p>4. Receptor metabotrópico</p> <p>5. Receptor a NMDA (canal de Calcio)</p> <p>6. Receptor no NMDA</p> <p>7. Retículo endoplasmático</p> <p>8. Sistema generador de 2º mensajero</p>	<p>9. Espina dendrítica</p> <p>10. Canal de Calcio regulado por voltaje</p> <p>11. Concentración de calcio en la espina dendrítica</p> <p>12. Quinasas dependientes de Calcio</p> <p>13. Sistema de generación de mensajeros retrógrados (NO, CO)</p> <p>14. Terminal nervioso hipersecretor</p> <p>15. Frecuencia de potenciales de acción que invaden el terminal</p>
--	---



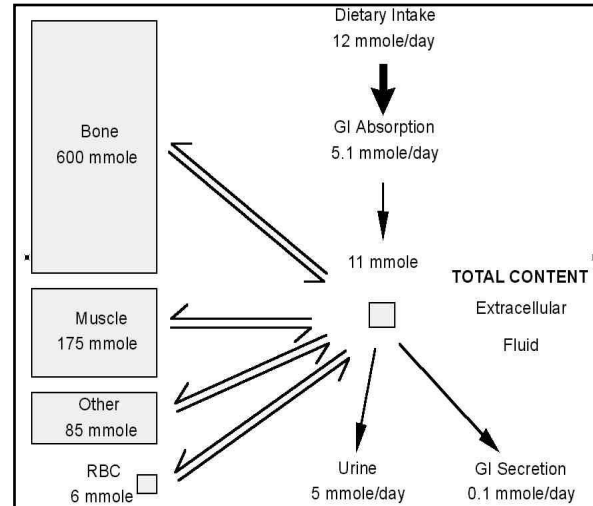
Los canales de calcio en el músculo son una forma de transporte activo primario que se encuentran a nivel mitocondrial, retículo sarcoplasmático, y membrana plasmática. Estos canales contribuyen en la contracción muscular (incluyendo miocardio) cuando el potencial de acción viaja a través de los nervios hasta las miofibrillas, en esta se da una despolarización a nivel de membrana, como consecuencia el retículo sarcoplasmático libera grandes cantidades de calcio almacenado. Los iones de calcio atraen a los filamentos de actina y miosina produciendo deslizamiento, y por ende, contracción muscular. Una vez ocurrido esto los iones calcio son bombeados de nuevo hacia el retículo sarcoplasmático por la bomba de  $\text{Ca}^{+2}$ , la cual es activada por los mismos iones Calcio, y estos iones permanecen almacenados hasta la siguiente contracción. A nivel de músculo liso esto es regulado por la unión entre  $\text{Ca}^{+2}$  y moléculas de calmodulina los cuales generan una fosforilación la cual genera la contracción muscular. El “Esquema 2” describe éste fenómeno de contracción muscular de un modo más explícito <sup>(20)</sup>.



ESQUEMA 2. FENÓMENO DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR

Es por eso, que al inhibirse el potencial de acción por el magnesio, no hay liberación de ión calcio por los canales y estos permanecen dentro del retículo sarcoplasmático y el músculo se encuentra en estado de relajación.

La distribución de las concentraciones de magnesio en todo el cuerpo se pueden apreciar en el “Esquema 3”. A nivel renal, sobre un 80% del magnesio sérico total es ultrafiltrable a través de la membrana glomerular. En todas las especies de mamíferos estudiados hasta la fecha, el túbulo proximal del animal adulto reabsorbe sólo una pequeña fracción, 10-15%, del magnesio filtrado.



**ESQUEMA 3. DISTRIBUCIÓN CORPORAL DEL MAGNESIO**  
(22)

En ratas, a diferencia del adulto, el túbulo contorneado proximal de las ratas jóvenes (entre 13-15 días) reabsorbe sólo el 50-60% de magnesio que se filtró a lo largo del túbulo proximal junto con el sodio, calcio y agua. Los experimentos de micro punción realizados en todas las especies estudiadas hasta la fecha, indica que una gran parte (aproximadamente 60%) del magnesio filtrado es reabsorbido en el asa de Henle. La reabsorción de magnesio en el asa de Henle se produce dentro de la rama gruesa ascendente (RGA) por medios pasivos impulsados por el voltaje transepitelial a través de la ruta paracelular. También se ha demostrado claramente por micropunción que la superficie del túbulo contorneado distal reabsorbe cantidades significativas de magnesio. A diferencia de la rama gruesa ascendente del asa de Henle, la reabsorción de magnesio en el túbulo distal es transcelular y naturalmente activa. Muchas hormonas y factores hormonales influyen en la reabsorción renal de magnesio de grado variable en la RGA y en el túbulo distal. Además, factores no hormonales pueden tener importantes implicaciones en el control hormonal de conservación renal de magnesio. La restricción dietética de magnesio conduce a la conservación de este con una disminuida excreción urinaria del ión. El incremento de magnesio

o calcio plasmático inhibe la reabsorción de calcio y magnesio que lleva a una hipermagnesiuria e hipercalcemia. <sup>(23)</sup>

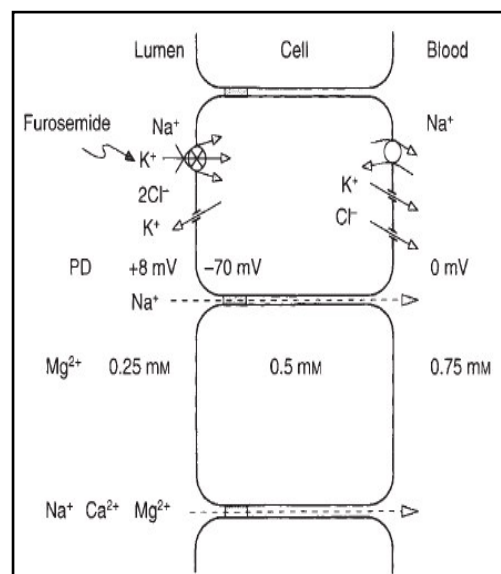
**Filtración Glomerular:** Aproximadamente el 70% del magnesio plasmático se encuentra como ión  $Mg^{2+}$ . El magnesio restante se une a proteínas circulantes (esencialmente albúmina) o es quelado con aniones citrato, oxalato y fosfato. Sobre un 80% del magnesio total en suero es ultrafiltrable través de la membrana glomerular. Con una tasa de filtración glomerular, TFG, de 125 mL / min, las cantidades de magnesio filtrados son alrededor de 140 mmol / día de los cuales el riñón reabsorbe un 80-99%. Por consiguiente, desde 1 - 20% del magnesio filtrado se excreta en la orina final en función de la ingesta dietética de magnesio. <sup>(23)</sup>

**Túbulo Contorneado Proximal:** El túbulo contorneado proximal de los animales inmaduros y maduros parece reabsorber magnesio en formas muy diferentes que pueden ser importantes en la interpretación de equilibrio del magnesio en los individuos jóvenes y adultos. En todas las especies de mamíferos estudiados hasta la fecha, el túbulo proximal del animal adulto reabsorbe sólo una pequeña fracción, 10-15%, del magnesio que se filtró. La diferencia de potencial transepitelial ( $V_t$ ) es de aproximadamente -2mV (lumen negativo) en las circunvoluciones temprano y el túbulo proximal y finales de los túbulos rectos es de aproximadamente 3mV (lumen positivo). Como la concentración de magnesio es superior a la de la concentración plasmática ultrafiltrable, la orientación del gradiente electroquímico favorece la difusión de magnesio desde el lumen a la sangre a lo largo de la mayor parte del túbulo proximal. Por lo general se asume que el magnesio se reabsorbe pasivamente a través de la vía paracelular. En túbulos perfundidos con soluciones de Ringer que contiene diversas cantidades de  $MgCl_2$ , la concentración de magnesio en las aguas abajo de fluidos tubulares desde el sitio de perfusión aumentó proporcionalmente a la reabsorción de agua si la concentración de magnesio estaba muy por debajo o por encima notablemente los niveles de magnesio en plasma ultrafiltrable. Estos datos indican una permeabilidad relativamente baja de magnesio del túbulo. Sin embargo, el túbulo proximal tiene una permeabilidad finita de magnesio como se demuestra por la afluencia de magnesio en el líquido recogido de magnesio libre de las

gotitas de aceite previamente inyectado en rellenos túbulos proximales contorneados. En general, se acepta que el sodio es reabsorbido principalmente a través de la ruta transcelular con una fracción más pequeña que se reabsorbe a través de la ruta paracelular. Está bien documentado que las uniones estrechas en las vías paracelulares son muy permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  por lo que será de interés para determinar si el  $\text{Mg}^{2+}$  puede moverse a través de las vías paracelulares tal como el  $\text{Na}^+$ . A diferencia del adulto en túbulo contorneado proximal de las ratas jóvenes (entre 13-15 días) se reabsorbe entre 50-60% del magnesio filtrado, junto con el sodio, el calcio y el agua. El descenso de la reabsorción fraccional de magnesio en el túbulo proximal en contraste con la de sodio y agua está en función de la edad. Es posible que la caída de la permeabilidad del  $\text{Mg}^{2+}$  es causado por una disminución de la permeabilidad paracelular probablemente en el nivel de las uniones estrechas. En paralelo con estos cambios, el túbulo proximal de la rata joven es incapaz de crear o mantener un gradiente de concentración transepitelial de  $\text{Cl}^-$ . Como las edades de las ratas (más allá de 3 semanas), el gradiente de  $\text{Cl}^-$  se desarrolla y aumenta con la edad. Por consiguiente, es posible que las alteraciones de maduración de la ruta paracelular puedan afectar a la permeabilidad de  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$  pero en grados diferentes. En el otro extremo de la escala de edad, la reabsorción fraccionaria de magnesio en las ratas senescentes (30 meses) es similar a la de la rata adulta (10 meses). En resumen, la reabsorción de magnesio neto en el túbulo proximal de los mamíferos es muy limitada. Este no es el caso de los animales inferiores. Beyenbach ha estudiado extensamente el transporte de magnesio en diferentes especies de peces. De acuerdo con Beyenbach, el magnesio podría entrar en la célula proximal a través de la membrana basolateral a través de canales  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mg} / \text{Cl}$  cotransporte y ser extruido a partir de la célula en el lumen del túbulo a través de la membrana apical. <sup>(23)</sup>

**Asa de Henle:** El magnesio se encuentra principalmente reabsorbido dentro de la rama gruesa ascendente del asa de Henle. Mediante técnicas de microperfusión en segmentos aislados de ratón, Rouffignac y Col. han demostrado que sólo la rama cortical gruesa ascendente del asa tiene que ver con la recuperación de magnesio pues no hay transporte como se observó en el segmento

medular. Además, ellos demostraron que el transporte de magnesio es principalmente pasivo en la naturaleza. La absorción de magnesio neta fue totalmente dependiente de la tensión transepitelial. Con un voltaje positivo luminal en un baño con sales de magnesio en el medio se evidenció una secreción de este ión en el lumen. Se prevé que el magnesio se mueve normalmente a través del epitelio de la rama cortical gruesa ascendente mediante la ruta paracelular impulsada por el voltaje positivo luminal transepitelial. <sup>(24)</sup>



**ESQUEMA 4. INTERCAMBIOS IÓNICOS A NIVEL RENAL.**

A nivel de la rama gruesa ascendente del asa, la parathormona, calcitonina, glucagón, la insulina y el isoproterenol estimulan el transporte de NaCl, magnesio y calcio en la rama gruesa cortical ascendente. Los mecanismos celulares responsables de estos efectos son relativamente bien conocidos.

En el ratón, el aumento de transporte de NaCl dependiente de hormonas a partir de un incremento en el voltaje, resulta como consecuencia de un aumento en la afluencia unidireccional de Cl a través de la membrana basolateral y de K a través del lado luminal. La estimulación del transporte de NaCl en la extremidad gruesa descendente se puede observar sólo después de una hora de equilibración siguiente montaje del segmento tubular. Durante este período, el transporte de NaCl es máximo y no puede incrementarse aún más por las hormonas. Paradójicamente, durante

el mismo período el transporte de magnesio y de calcio puede ser estimulado. Además, cuando en el túbulo se ha alcanzado un nivel estacionario, el aumento de transporte de magnesio y calcio inducido por hormonas no es proporcional al incremento en el voltaje. El transporte de magnesio es si no casi exclusivamente pasivo. Cuando la diferencia de potencial- transepitelial se impone, las hormonas aumentan los flujos de reabsorción de magnesio y calcio en presencia como en ausencia de transporte activo de NaCl y en ausencia de cualquier variación en el voltaje. <sup>(23)</sup>

En el “Esquema 4” se observan los factores que controlan la absorción de magnesio en éste segmento a través de cambios en el voltaje y/o la permeabilidad de la ruta paracelular. En la “Tabla 1” se indican las sustancias químicas que alteran la reabsorción del magnesio a nivel de la RGA y túbulo distal. En el “Esquema 5” las condiciones que regulan el transporte de magnesio. Wittner ha demostrado que la permeabilidad de la ruta paracelular puede estar influida por la edad y sexo de modo que los cambios de maduración pueden influir en el transporte pasivo de magnesio en la rama cortical gruesa. Como con todas las células, el magnesio intracelular es esencial para el metabolismo celular normal. Hemos demostrado que el magnesio entra en las células a través de la rama cortical gruesa por vías de entrada selectivos, probablemente a través de los canales de  $Mg^{+2}$ . Si este transporte celular de magnesio juega un papel en la absorción transepitelial todavía no se conoce; pero la mayoría de las veces, si no todas, la absorción de magnesio dentro del bucle es paracelular.

(24)

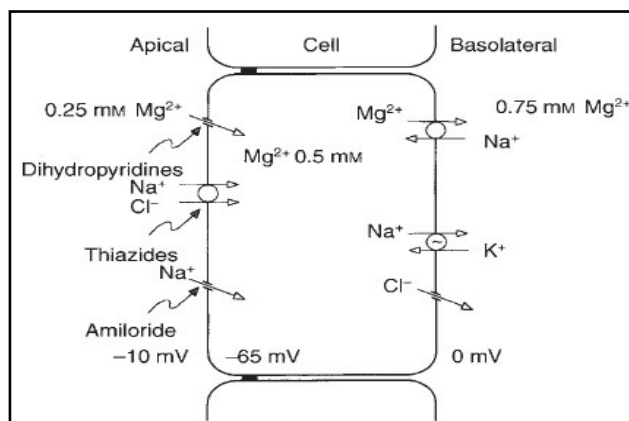
**TABLA 1. SUSTANCIAS QUE ALTERAN LA REABSORCIÓN DE MAGNESIO EN LOS RIÑONES.**

<i>Sustancias que Alteran la Reabsorción Renal de Magnesio</i>		
<b>Rama Gruesa Ascendente del Asa de Henle</b>		
Incrementa la Absorción	Hormonas	Hormona Paratiroidea
		Calcitonina
		Glucagón
		Vasopresina
		Isoproterenol
		Insulina
Reduce la Absorción	Restricción en la dieta de Magnesio	
	Alcalosis metabólica	
	Hipermagnesemia	
	Hipercalcemia	
	Diuréticos de asa	Furosemida
		Bumetanida

Túbulo Distal		
Incrementa la Absorción	Hormonas	Hormona Paratiroidea
		Calcitonina
		Glucagón
		Vasopresina
	Diuréticos	Amilorida
		Hidroclorotiazida
Reduce la Absorción	Restricción en la dieta de Magnesio	
	Alcalosis metabólica	
	Acidosis metabólica	
	Depleción de Fósforo	
	Depleción de Potasio	

**Túbulo Distal:** El túbulo distal normalmente reabsorbe aproximadamente el 10% del magnesio que se filtró a través de los glomérulos. Aunque esto parece una pequeña cantidad, que representa 70 a 80% del magnesio entregado a este segmento del asa de Henle. Como la reabsorción de magnesio poco más allá del túbulo distal no es en los conductos colectores, los segmentos tubulares que comprenden esta porción de la nefrona juegan un papel importante en la determinación de la excreción urinaria final de magnesio. <sup>(24)</sup> El papel de este segmento nefrona en el control de magnesio ha sido relativamente ignorado debido a las mayores cantidades recuperadas en el bucle. Sin embargo, estudios recientes indican que el túbulo contorneado distal puede desempeñar un papel más importante que el reconocido previamente. La mayor parte de nuestro conocimiento en principios de materia de transporte de magnesio en el túbulo distal ha venido de los estudios y micropunción-microperfusión de la nefrona superficial. Los estudios mostraron que por micropunción cantidades significativas de magnesio se reabsorben en el túbulo distal. El túbulo distal de los mamíferos, situado entre la mácula densa y el conducto colector cortical, se compone de un segmento denso corto después de la mácula de la rama gruesa ascendente, el túbulo contorneado distal (TCD), el túbulo de conexión y el túbulo colector inicial. Los estudios que describen la absorción de magnesio por micropunción distal bien puede haber incluido porciones del túbulo superficial de conexión y el túbulo colector inicial. La absorción de magnesio dentro de cada uno de estos segmentos individuales aún no se ha estudiado. El túbulo contorneado distal (TCD), no ha sido ampliamente estudiado debido a su inaccesibilidad y la dificultad en el aislamiento para los estudios de microperfusión in vitro. Líneas celulares inmortalizadas del TCD se han utilizado

recientemente para describir el transporte de magnesio celular. <sup>(25)</sup> Nuestros estudios iniciales examinaron los cambios en el ingreso de Mg en las células después de generar alteraciones en el voltaje de la membrana.

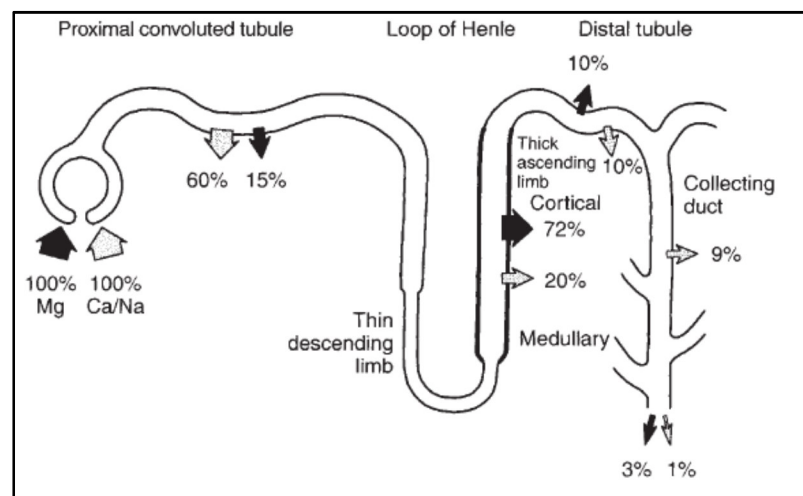


**ESQUEMA 5. CONDICIONES QUE INFLUYEN EN EL TRANSPORTE DE MAGNESIO**

Estos estudios evidencian que el más negativo es el voltaje de la membrana, es decir, en una hiperpolarización, mayor es la tasa de flujo de magnesio. A la inversa, la despolarización de voltaje de la membrana disminuye la absorción de magnesio. La dependencia de la entrada de magnesio en la fuerza motriz inducida por el gradiente electroquímico indica que la entrada Mg celular puede ser mediada por un canal de iones. A medida que el túbulo distal se caracteriza por un voltaje negativo luminaltransepitelial y resistencia epitelial alta, se concluye que el transporte de magnesio es activo y naturalmente transcelular. La evidencia es que el magnesio se mueve pasivamente en la célula a través de la membrana luminal impulsado por un voltaje de transmembrana favorable. La concentración de magnesio luminal en el túbulo distal es del orden de 0,2 a 0,7 mEq dependiendo de la condición estudiada, y  $Mg_2$  libre intracelular es de aproximadamente 0,5 mEq. Por lo tanto, bajo alguna circunstancia la entrada  $Mg_2$  está en contra de un gradiente de concentración apreciable. Se cree que la entrada de Mg es a través de un canal único y el transporte depende del voltaje de transmembrana. Se prevé que el paso activo en movimiento transcelular sea en la membrana basolateral donde el  $Mg_2$  sale de la célula contra gradientes tanto eléctricos y de concentración. El medio por el cual  $Mg_2$  activamente se mueve a través de la membrana basolateral es desconocido.



La evidencia proveniente de estudios que utilizan células epiteliales sugieren que un cambio de concentración  $\text{Na}^+ \text{-} \text{Mg}^{+2}$  puede ocurrir; el Na ha de regresar a la célula junto con el  $\text{Mg}^{+2}$  que sale de la célula hacia el intersticio, tal como se aprecia en el “Esquema 6”. En este punto de vista, los factores que influyen en la absorción de magnesio transcelular incluyen alteraciones de la etapa de entrada en la membrana luminal y cambios en la actividad de la etapa de salida en la membrana basolateral. Al igual que con otros iones, es probable que la etapa de entrada es limitante de la velocidad y controla la reabsorción de magnesio en las células transepiteliales del TCD. <sup>(24)</sup>



**ESQUEMA 6. ABSORCIÓN DEL MAGNESIO A TRAVÉS DEL NEFRÓN RELACIONADO A LA ABSORCIÓN DE SODIO Y CALCIO.**

### **Hipermagnesemia e Hipercalcemia**

La elevación de la concentración plasmática de magnesio o de calcio inhibe la reabsorción de magnesio y calcio a nivel renal lo que conduce a hipermagnesiuria e hiper calciuria. La inhibición de la reabsorción se produce dentro de la rama gruesa ascendente del asa de Henle y el túbulo contorneado distal. En el asa donde el magnesio se reabsorbe pasivamente, una elevación de magnesio o calcio extracelular puede disminuir la permeabilidad de estos cationes en la ruta paracelular de modo que para cualquier tensión transepitelial hay menos absorción de magnesio y de calcio. Estudios de microperfusión in vivo en rata de segmentos rama gruesa ascendente mostró claramente que los aumentos en las concentraciones de magnesio luminal se asocia con aumentos en las tasas de absorción de magnesio. Sin embargo, la elevación plasmática de calcio o magnesio,

en el lado basolateral de la rama gruesa ascendente, dio lugar a la inhibición tanto de la absorción de magnesio y de calcio. En el túbulo distal, donde el magnesio se reabsorbe activamente, los experimentos de microperfusión mostraron que en hipermagnesemia e hipercalcemia se inhibe la absorción de magnesio. La identificación de un receptor de detección de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  extracelular situado en el lado de las células peritubulares de la rama gruesa ascendente puede explicar este fenómeno. Es probable que el receptor de detección juega un papel en el control del transporte paracelular de calcio y magnesio. A su vez, este detector actúa por mecanismos distintos a los descritos en el asa. La evidencia es que el receptor en las células actúa a través de la proteína G para disminuir las hormonas y estimular los niveles de cAMP y por lo tanto estimular el transporte de magnesio. Finalmente, la elevación de los cationes divalentes en el conducto colector medular activa el receptor luminal sensible a  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  que disminuye la permeabilidad al agua e inhibe la reabsorción de volumen. El efecto neto consiste en aumentar el flujo de volumen, junto con un aumento de la excreción de calcio y magnesio. Es decir, un incremento concomitante en el flujo de volumen con la inhibición de la reabsorción de calcio y magnesio reduciría al mínimo la incidencia de la formación de cálculos. <sup>(23, 26)</sup>

Por otro lado, el riñón posee un máximo nivel tubular para el transporte que puede ser saturado con elevaciones de magnesio en plasma, con lo que inactiva al receptor luminal sensible a  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  y se empieza a dar una acumulación de estos iones a nivel celular, lo que ocasionaría daños en diferentes niveles en donde este tipo de receptores se hallase presente. <sup>(26)</sup>

## **1.5 INTOXICACIÓN POR MAGNESIO**

El ión magnesio es un poderoso depresor del sistema nervioso central y de la transmisión neuromuscular. Las manifestaciones de la intoxicación son depresión de reflejos, parálisis flácida, hipotensión, hipotermia, coma e insuficiencia respiratoria (a causa de la relajación de los músculos lisos respiratorios). Por lo común, el paro respiratorio precede a la depresión profunda del miocardio. Los efectos del magnesio sobre las funciones neurológicas y neuromusculares son

antagonizadas por el calcio, el cual se usa como tratamiento. El exceso de magnesio se manifiesta en el electrocardiograma por un aumento de los intervalos PR y QRS, elevación de la onda T, bloqueo aurículoventricular de distinto grado y contracciones ventriculares prematuras. <sup>(18)</sup> La depresión del sistema nervioso central se presenta a concentraciones séricas de 8 mEq/L y la anestesia profunda con valores de 20 mEq/L. Niveles superiores llevan progresivamente a la depresión respiratoria, coma y muerte. <sup>(17)</sup>

## **1.6 TRATAMIENTO**

- Se debe forzar la diuresis del Magnesio, bebiendo abundante agua o empleando diuréticos de asa.
- En caso de ser una emergencia que presente alteraciones en el ECG se debe administrar Gluconato de Calcio al 10% de 10 a 20 ml IV en 10 minutos. <sup>(27)</sup>

## **1.7 SUPLEMENTOS NUTRICIONALES**

Se conoce como suplemento nutricional a cualquier producto cuya ingestión tenga como finalidad la de complementar la dieta alimenticia. Contiene, o puede contener:

- a) Uno o más de los siguientes ingredientes: vitaminas, minerales, aminoácidos, y otros elementos procedentes del reino vegetal o animal.
- b) Una sustancia dietética utilizada para aumentar la ingesta energética total.
- c) Un concentrado, metabolito, constituyente, extracto, o combinación de cualquiera de los ingredientes antes mencionados.
- d) Un preparado para su ingestión en forma de píldora, cápsula, tableta, polvo, gel, extracto, líquido, barra alimenticia, galleta etc., que no esté presentado como alimento convencional o como parte de una comida o de una dieta.

En gran número de países la forma más frecuente del suplemento nutricional se hace en forma de tabletas o cápsulas, conteniendo multivitaminas y/o multiminerales, despachadas en oficinas de farmacia.

La presencia y evolución de los suplementos nutricionales asienta básicamente en el hecho de que, en la actualidad, las áreas de interés de la nutrición están centradas en la relación existente entre alimentación y enfermedades crónicas no transmisibles y en los efectos que la nutrición tiene sobre algunos aspectos específicos de los humanos, como son las funciones cognitivas, las inmunitarias y el rendimiento deportivo, entre otras.

Ciertamente que muchos suplementos dietéticos tienen como objetivo determinadas necesidades especiales y grupos de edades. Sin embargo, conviene insistir en que todas las necesidades nutricionales pueden obtenerse manteniendo una dieta balanceada. Algunos grupos, que podrían necesitar suplementos dietéticos especiales, son: niños pequeños, mujeres embarazadas y lactantes, vegetarianos, deportistas, alcohólicos, enfermos, ancianos, otros.<sup>(28)</sup>

No se ha demostrado que ingerir altas dosis de suplementos dietéticos sea efectivo. Es más, en ocasiones puede ser tóxico. No es recomendable suplementar la dieta con vitaminas u otros nutrientes en cantidades superiores a las recomendadas por organismos competentes. Medicamentos como antiácidos, anticonvulsivantes, antibióticos, laxantes o algunos antidepresivos pueden interferir con la capacidad del organismo para metabolizar ciertas vitaminas y minerales. Otros, tienen efectos adversos sobre la nutrición al originar estreñimiento, diarrea, náuseas y molestias abdominales.<sup>(14)</sup>

En los casos en los que detecte o se admita la existencia de deficiencia nutricional es aceptable la ingesta de suplementos nutricionales, dos o tres veces por semana, para equilibrar la deficiencia, aunque todos los casos deben ser controlados por un médico. Previniendo la desnutrición, se puede reducir el uso de antibióticos y otros medicamentos. Las cantidades diarias recomendadas de suplementos oscilan entre el 50% y el 150% de las IDAs, conviene evitar productos

que contengan más del 100% de IDAs, para las vitaminas A y D. Es peligroso ingerir más de 10 veces las IDAs de cualquier vitamina o mineral. <sup>(28)</sup>

**TABLA 2. BENEFICIOS DE EMPLEAR LOS SUPLEMENTOS DE MAGNESIO**

<b>SISTEMA NEUROMUSCULAR</b>	
Interviene en la excitabilidad neuronal y muscular	
<b>CORAZÓN</b>	
Cardioprotector	Antihipóxico
Antiisquémico	Afecta la contractibilidad
<b>SISTEMA CIRCULATORIO</b>	
Protege las paredes de los vasos	Genera vasoconstricción
<b>SANGRE</b>	
Es un agente antitrombótico	Aumenta la producción de leucocitos
Estabiliza los eritrocitos	
<b>OTROS</b>	
Interviene en la transmisión genética	Activa las funciones hepáticas
Coopera en el metabolismo mineral	Interviene en la formación de surfactante pulmonar
Activa la movilidad de los espermatozoides	Necesario para la síntesis de hormonas
Necesario en el crecimiento y maduración ósea	Interviene en el proceso antialérgico <sup>(17)</sup>

Se puede tomar en forma de comprimidos, cápsulas o polvo. Las principales sales en que se encuentran en el mercado son: citrato de magnesio, cloruro de magnesio, aspartato de magnesio y óxido de magnesio (aunque éste se absorbe muy poco en el organismo). <sup>(28)</sup> En la Tabla 2 figuran los principales beneficios del uso de suplementos de magnesio.

## II. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. MUESTRA DE ESTUDIO

- Para realizar este trabajo de investigación se emplearon animales jóvenes (2 meses de edad) de acuerdo con las directrices de la OECD (Anexo I) de cepas de laboratorio de la especie *Rattus norvegicus* cepa Holtzman de ambos sexos. Las hembras fueron nulíparas y no grávidas.
- Se emplearon 36 ratas (18 machos y 18 hembras) de la especie *Rattus norvegicus*.
- Los estudios de toxicidad crónica de la investigación, se llevaron a cabo en un período de 6 meses aproximadamente.
- Cada animal fue marcado y agrupado de acuerdo a la dosis a administrar.
- Se emplearon animales sanos, aclimatados a las condiciones de laboratorio durante al menos 7 días y no fueron sometidos a experimentos previos (Anexo II).

### 2.2. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

#### 2.2.1 MATERIALES

- |                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| • Jaulas                            | • Frascos dosificadores                       |
| • Jaulas de diuresis                | • Probeta                                     |
| • Guantes quirúrgicos               | • Jeringas por 5mL                            |
| • Tubos de ensayo                   | • Pipetas volúmetricas de 1 mL, 5 mL y 10 mL. |
| • Recipientes plásticos de análisis | • Micropipetas                                |
| • Equipo de disección               | • Tips  |
| • Tabla de disección                |   |
| • Gradilla                          |   |

### 2.2.3 REACTIVOS

- Cloruro de Magnesio Hexahidratado BP, USP Lote: M1364 (Anexo III).
- Agua destilada
- Solución de formol al 10%
- Colorante hematoxilina - eosina
- Para determinación de úrea:
  - Solución de ureasa
  - Reactivo de fenol y nitroprusiato sódico (fenol cristalizado 50 g; nitroprusiato sódico 0,25g; agua destilada c.s.p. 1000 mL).
  - Reactivo de hipoclorito de sodio alcalino al 2,65%
- Para determinación de proteínas totales:
  - Reactivo de Biuret ( $\text{CuSO}_4$  1,5 g; tartrato de sodio y potasio 6g; NaOH al 10% 300 mL; KI 1g; agua destilada c.s.p. 1000 mL).
  - Solución de NaCl 9‰
- Para determinación de Ácido Úrico:
  - Solución de ácido túngstico
  - Reactivo de ácido fosfotúngstico
  - Solución de carbonato de sodio al 14%
  - Solución estándar de ácido úrico
- Para determinación de Creatinina:
  - Solución de ácido pícrico a 11,75‰
  - Solución de NaOH 10%
  - Solución Estándar de Creatinina
- Examen Químico de Orina
  - Tiras reactivas URIT Urine reagent strips URITEST 11G

### 2.2.2 EQUIPOS

- Balanza analítica METTLER TOLEDO Laboratory Balance Modelo AL204
- Balanza digital HENKEL Modelo BRD01
- Centrífuga HETTICH Modelo ROTOFIX 32A
- Analizador Bioquímico Semiautomático EMPEROR Modelo EMP-168
- Microscopio óptico OLYMPUS Modelo CX21LED
- Termohigrómetro RADIOSHACK Modelo 63-1032

## 2.3 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

### 2.3.1 ALOJAMIENTO Y ALIMENTACIÓN

Se utilizaron jaulas como alojamiento, en las cuales se reunió pequeños grupos del mismo sexo y dosis, siendo 4 el máximo número de ocupantes por jaula. La temperatura en la sala de experimentación fue de un promedio de 22 ° C ( $\pm 3$  ° C). La iluminación fue artificial, la secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación, se empleó alimento balanceado para ratas proveniente de la Universidad Nacional Agraria de la Molina (UNALM) con un suministro ilimitado de agua potable. <sup>(29, 30)</sup>

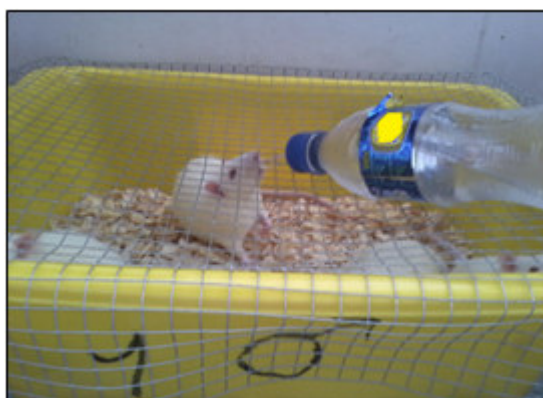


IMAGEN 1. ALIMENTACIÓN Y ALOJAMIENTO



### 2.3.2 CÁLCULO DE LA DOSIS

Fueron administradas 2 tipos de dosis. De acuerdo con el Departamento de Nutrición del Instituto de Medicina de EEUU (IOM), la ingesta diaria admisible (IDA) de magnesio en seres humanos es de 300 mg/día, y de acuerdo con el Index Merck la Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>) del magnesio en ratas es de 8,1 mg/g de peso. Es por ello que se administraran dosis por encima de la IDA pero por debajo de la DL<sub>50</sub>.

- Grupo 1. Control
- Grupo 2 – D1. Dosis 600 (600 mg de Mg<sup>+2</sup>/día)
- Grupo 3 – D2. Dosis 1200 (1200 mg de Mg<sup>+2</sup>/día).

#### DISEÑO

GRUPO	CANTIDAD DE MACHOS	CANTIDAD DE HEMBRAS
CONTROL	6	6
DOSIS 600 – D1	6	6
DOSIS 1200 – D2	6	6

- La dosis fue administrada por vía oral Ad. Libitum. <sup>(30)</sup>

La dosis fue calculada de acuerdo a la concentración mostrada por el certificado del producto (Anexo II) de la siguiente manera:

Partiendo de una persona promedio de 70 Kg en la cual su IDA sea 300 mg de Mg<sup>+2</sup>/día, la dosis 1 se experimenta con el doble de la IDA por ser una cantidad que se encuentra por debajo de los niveles no observados de efectos adversos para ratas (NOAEL: 1 309 mg/kg, OECD Guideline 422). Pero el peso de una rata promedio es de 200 g, entonces:

600 mg ----- 70 Kg

600 mg ----- 70000 g

**1.71 mg ----- 200 g**

Como la dosis es Ad libitum, es administrada en el agua de bebida. El promedio de agua que bebe una rata es de aproximadamente 20 mL diarios. <sup>(31)</sup> Entonces se debe administrar 1.71 mg de  $Mg^{+2}$  en 20 mL de agua por día.

Pero el Magnesio administrado será en forma de sal hidratada.

$MgCl_2 \cdot 6H_2O = 203.3$

Entonces:

#### Dosis 1

24 g de $Mg^{+2}$	-----	203.3 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
<b>1.71 mg de <math>Mg^{+2}</math></b>	-----	<b>14.49 mg de <math>MgCl_2 \cdot 6H_2O</math></b>

Por lo tanto se debe disolver en 20 mL de agua 14.49 mg de la sal hidratada.

#### Dosis 2

Para la dosis 2 se experimenta con una concentración del doble de la dosis 1 IDA por ser una cantidad que todavía se encuentra por debajo de los niveles no observados de efectos adversos para ratas. Pero, el peso de una rata promedio es de 200 g, entonces:

1200 mg	-----	70 Kg
1200 mg	-----	70000 g
<b>3.43 mg</b>	-----	<b>200 g</b>

Cantidad en sal hidratada:

24 g de $Mg^{+2}$	-----	203.3 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
<b>3.43 mg de <math>Mg^{+2}</math></b>	-----	<b>29.05 mg de <math>MgCl_2 \cdot 6H_2O</math></b>

Por lo tanto se debe disolver en 20 mL de agua 29.05 mg de la sal hidratada.

### 2.3.3 OBSERVACIONES

Los animales fueron revisados semanalmente, preferiblemente a la misma hora, teniendo en cuenta el período agudo de los efectos previstos tras la administración. Se realizó el pesado semanal de los animales. Las observaciones de signos específicos de relevancia toxicológica, signos neurofuncionales y comportamiento de los animales fueron registrados, tanto dentro y fuera de la jaula de alojamiento. Anotándose signos como cambios en los ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones, y actividad neurovegetativa. Cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como también la presencia de movimientos clónicos o tónicos, estereotipias o comportamientos anómalos.<sup>(30)</sup>



IMAGEN 2. OBSERVACIÓN A LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

### 2.3.4 HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA CLÍNICA

Se realizaron exámenes hematológicos mensualmente tanto a hembras como a machos. Las muestras de sangre se tomaron de los animales sacrificados (específicamente de la arteria aorta abdominal<sup>(31)</sup>), investigándose parámetros como ácido úrico, creatinina, proteínas totales y urea. Los últimos días se alojaron a los animales restantes en jaulas metabólicas con el fin de

recolectar orina. <sup>(30)</sup> Los resultados de los análisis de los datos se compararan mediante ANOVA para datos no pareados.

Los análisis de sangre y orina fueron realizados por el Servicio Académico Asistencial de Análisis Clínicos (SAAAC) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

### **2.3.5 AUTOPSIA**

Todos los animales en el estudio fueron sometidos a una autopsia macroscópica, en la cual se colocó al animal en una campana de vidrio saturada con éter. Una vez sedado, se colocó sobre una tabla de disección y se hizo un corte longitudinal a nivel del abdomen del animal. Luego, con la ayuda de unas pinzas y tijeras se distendieron las vísceras entéricas visualizándose los riñones. <sup>(31)</sup> Estos se extrajeron y colocaron en un recipiente conteniendo una solución de formol al 10% para su preservación.



**IMAGEN 3. AUTOPSIA DEL ANIMAL.**

### **2.3.6 HISTOPATOLOGÍA**

Se realizó un estudio histopatológico de los riñones, especialmente a nivel de la rama gruesa ascendente del asa de Henle y la corteza medular renal. El estudio histológico fue realizado por el Laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.

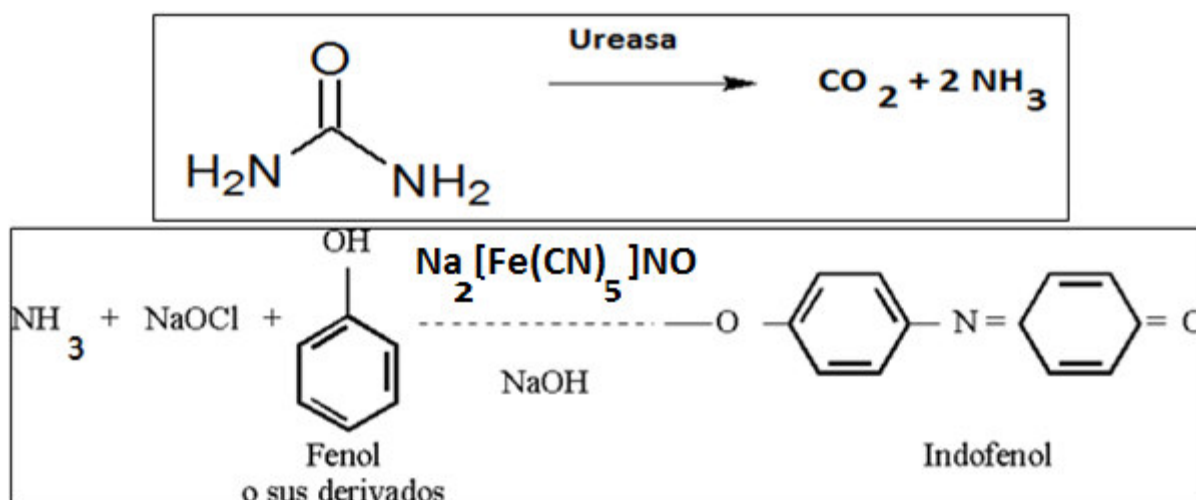
## 2.4 TÉCNICA OPERATORIA

Los siguientes análisis fueron realizados por el servicio de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

### 2.4.1 TÉCNICA OPERATORIA PARA LA DETERMINACIÓN DE UREA EN SANGRE. MÉTODO DE CHANEY Y MARBACH <sup>(32)</sup>

#### 2.4.1.1 Fundamento

La técnica se basa en la reacción de hidrólisis de la urea por la enzima ureasa dando como productos al  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ . Este último reacciona luego con el fenol y el hipoclorito de sodio en medio alcalino, y se produce un color azul de indofenol (reacción de Berthelot) el cual se lee en el espectro de absorción visible a 525 nm.



ESQUEMA 7. REACCIÓN DE BERTHELOT.

#### 2.4.1.2 Interferencias

Se pueden producir falsos positivos por ingestión de ácido etacrínico y sus derivados, ácido nalidíxico, compuestos arsenicales, bacitracina, clorobutanol, compuestos de antimonio, compuestos mercuriales, diuréticos tiazídicos, estreptoquinasa, gentamicina, neomicina, polimixina B, etc.

### 2.4.1.3 Precauciones

- Se debe utilizar sólo suero o plasma. La sangre total no puede usarse por la interferencia de la hemoglobina.
- No se deben emplear los fluoruros y sales de arsénico como anticoagulantes porque inhiben la ureasa.
- Siendo los reactivos muy sensibles al amoníaco, debe realizarse la prueba en un ambiente libre de vapores amoniacales.

### 2.4.1.4 Método Operatorio

- En tres tubos, marcados Estándar, Muestra y Blanco, se coloca:

**Tabla 3. Proporción de reactivos según el método de Chaney y Marbach**

	Estándar	Muestra	Blanco
Agua destilada	1 gota	1 gota	1 gota
Solución estándar de urea	0,02 MI	-	-
Suero o plasma	-	0,02 mL	-
Solución de Ureasa	1 gota	1 gota	1 gota

- Incubar 5 minutos en baño de agua a 50° C (40 – 50° C).
- Luego agregar a todos los tubos 1 mL de reactivo de fenol y 1 mL de reactivo de hipoclorito alcalino. Agitar bien.
- Incubar nuevamente bajo las mismas condiciones señaladas líneas arriba.
- Sacar los tubos del baño y agregar a todos 10 mL de agua y mezclar con agitación.
- Leer en el espectro visible a 525 nm poniendo a cero con el blanco de reactivos.
- Se determina la concentración mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{Abs\ muestra}{Abs\ estándar} \times 60 = \frac{mg}{100} de\ urea\ de\ la\ muestra$$

## 2.4.2 TÉCNICA OPERATORIA PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN SANGRE. MÉTODO DE GORNALL, BARDWALL Y DAVID <sup>(32)</sup>

### 2.4.2.1 Fundamento

Las proteínas del suero poseen enlaces peptídicos los cuales reaccionan con el ión cúprico para dar una coloración violeta estable (Reacción de Biuret) el cual se lee en el espectro de absorción visible a 540 nm siendo ésta proporcional a la concentración total de proteínas presentes en la muestra.

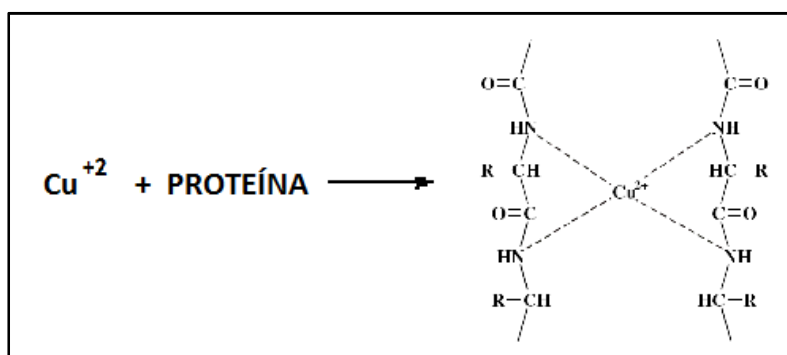


FIGURA 10. FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN DE BIURET

### 2.4.1.2 Interferencias

No se observa interferencia por bilirrubina hasta 100 mg/L, ni hemólisis ligera y en ningún caso se presenta turbiedad por quilomicrones. La ingestión de compuestos amoniacales, pirazinamida, etc. pueden dar falsos positivos.

### 2.4.2.3 Precauciones

- Se debe utilizar sólo suero libre de hemólisis.
- Usar guantes quirúrgicos para el manejo del reactivo de Biuret pues es irritante para los ojos, piel y mucosas.

#### 2.4.2.4 Método Operatorio

- En tres tubos, marcados Estándar, Muestra y Blanco, se coloca:

**Tabla 4. Proporción de reactivos en según el método de Gornall, Bardwall y David**

	Estándar	Muestra	Blanco
Solución de NaCl 9 ‰	-	-	2 mL
Solución de suero estándar	2mL	-	-
Suero *	-	2 mL	-
Reactivo de Biuret	8 mL	8 mL	8 mL

\* Este suero debe ser diluido con NaCl 9‰ de tal manera que se obtenga una concentración final de 5%.

- Se deja reaccionar a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Leer en el espectro visible a 540 nm poniendo a cero con el blanco.
- Se determina la concentración mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{C}{St} \times (M) = g \text{ de proteínas } \%$$

Dónde M es la absorbancia de la muestra, St es la absorbancia del estándar y C es la concentración de proteínas presente en el estándar.

#### 2.4.3 TÉCNICA OPERATORIA PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO EN SANGRE.

##### MÉTODO DE CARAWAY <sup>(32)</sup>

##### 2.4.3.1 Fundamento

En medio alcalino, el ácido úrico es oxidado fácilmente por diversos agentes, con formación de alantoína y anhídrido carbónico. Utilizando como agente oxidante el ácido fosfotúngstico, éste se reduce y da lugar al azul de tungsteno. La estructura química del compuesto coloreado no es bien conocida, aunque corresponde a óxidos inferiores del tungsteno.



#### 2.4.3.2 Interferencias

La ingestión de ácido ascórbico, ácido nicotínico, acetazolamida, diuréticos orales, mercaptopurina, meticiclina, metildopa, oxalato de potasio, oxalato de sodio, salicilatos, entre otros dan falso positivo o aumento de urea.

#### 2.4.3.3 Precauciones

- Las muestras deben ser preferentemente frescas, caso contrario mantenerlas a una temperatura de 20 – 25° C a lo mucho por tres días.
- La reacción de color sólo es estable durante 30 minutos.
- Usar guantes quirúrgicos para el manejo de los reactivos pues son irritantes para los ojos, piel y mucosas.

#### 2.4.3.4 Método Operatorio

- A 9 mL de solución de ácido túngstico agregar gota a gota 1 mL de suero, agitar, dejar unos minutos en reposo y centrifugar para desproteinizar.
- En tres tubos, marcados Estándar, Muestra y Blanco, se coloca:

**Tabla 5. Proporción de reactivos en según el método de Caraway**

	Estándar	Muestra	Blanco
Agua destilada	-	-	3 mL
Solución estándar de ácido úrico	3 mL	-	-
Sobrenadante de muestra	-	3 mL	-
Carbonato de sodio 14%	1 mL	1 mL	1 mL
Ácido fosfotúngstico	1 mL	1 mL	1 mL

- Mezclar y dejar en reposo por 15 minutos.
- Proceder a leer en el espectro visible a 710nm contra el blanco.
- Se determina la concentración mediante la siguiente ecuación:

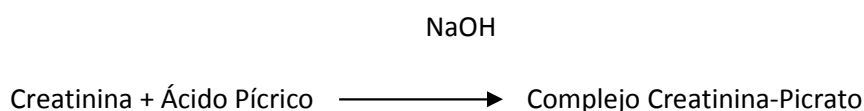
$$\frac{Abs\ muestra}{Abs\ estándar} \times 10 = mg/100mL$$

## 2.4.4 TÉCNICA OPERATORIA PARA LA DETERMINACIÓN DE CREATININA EN SANGRE.

### MÉTODO DE POPPER, MANDEL Y MAYER <sup>(32)</sup>

#### 2.4.4.1 Fundamento

En medio alcalino, la creatinina con el ácido pícrico forma un compuesto de color rojo anaranjado por la formación de un complejo, en el cual la absorbancia de éste es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra.



#### 2.4.4.2 Interferencias

La ingestión de ácido ascórbico, aspirina, colistina, dextrosa, estreptodornasa, estreptoquinasa, kanamicina, levulosa, manitol, metilciclina, piruvato, proteínas, viomicina, entre otros dan falso positivo.

#### 2.4.4.3 Precauciones

- Durante el proceso de reacción debe mantenerse una temperatura constante de 25° C ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ).
- Es importante que la muestra se halle desproteinizada para evitar interferencias.
- Usar guantes quirúrgicos para el manejo de los reactivos.

#### 2.4.4.4 Método Operatorio

- En un tubo se colocan 8 mL de solución de ácido pícrico y 2 mL de suero o plasma; y se agita y sumerge el tubo en un baño de agua en ebullición durante 30 segundos.
- Se centrifuga en caliente para precipitar las proteínas y se toma el sobrenadante.
- En tres tubos, marcados Estándar, Muestra y Blanco, se coloca:

**Tabla 5. Proporción de reactivos en según el método de Popper, Mandel y Mayer**

	Muestra	Blanco	Estándar
Sobrenadante	5 mL	-	-
Agua destilada	-	1 mL	-
Ácido pícrico 11,25 ‰	-	4 mL	-
Sol. Estándar de Creatinina	-	-	5 mL
Hidróxido de sodio al 10%	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL

- Agitar y dejar en reposo en un baño maría a 25° C por 20 minutos.
- Proceder a leer en el espectro visible a 520 nm poniendo a cero con el blanco.
- Se determina la concentración mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{Abs\ muestra - Abs\ blanco}{Abs\ estándar - Abs\ blanco} = creatinina\ g/L$$

## 2.4.5 ANÁLISIS QUÍMICO DE ORINA <sup>(33)</sup>

### 2.4.5.1 Fundamento

La orina posee ciertos componentes químicos que reaccionan con aquellos que se encuentran impregnados en las tiras reactivas URIT Urinereagentstrips URITEST 11G generando una reacción de coloración la cual se hace visible en la tira y se compara con una tabla colorimétrica para determinar si la reacción fue positiva o negativa.

### 2.4.5.2 Interferencias

Ciertos componentes que puedan dar falsos positivo para la determinación de albúminas, glucosa, pigmentos sanguíneos y biliares, urobilinógenos, nitritos y cetonas también afectan a éste método.

### 2.4.5.3 Método Operatorio

- En un recipiente se coloca una determinada cantidad de orina y se sumerge la tira reactiva en ésta, embebiéndose por completo las tiras coloreadas durante unos segundos.

- Se comparan los colores de la tira con los de la escala colorimétrica que vienen adjuntas a las tiras reactivas en su empaque.

### III. RESULTADOS

#### 3.1 OBSERVACIONES

El estudio no produjo efectos tóxicos significativos reflejándose un comportamiento normal de ganancia de peso, consumo de alimentos y ausencia de signos tóxicos y mortalidad atribuible a la prueba. No obstante, se apreció una hiporreflexia (reacción a estímulo baja) en los grupos con dosis 1 y dosis 2 siendo más notoria en la dosis 2, en comparación con el grupo control, la cual se mantuvo a lo largo del estudio. Durante los dos primeros meses se apreciaba una letargia tanto en el grupo dosis 1 y dosis 2. En los meses 3, 4 y 5 ésta letargia persistía acompañada de somnolencia, mientras que el grupo control mantenía un comportamiento normal.

#### 3.2 PESOS

**CUADRO N°1. PESOS DE LOS ANIMALES DE LOS GRUPOS CONTROL, DOSIS 1 Y DOSIS 2 A LO LARGO DEL ESTUDIO**

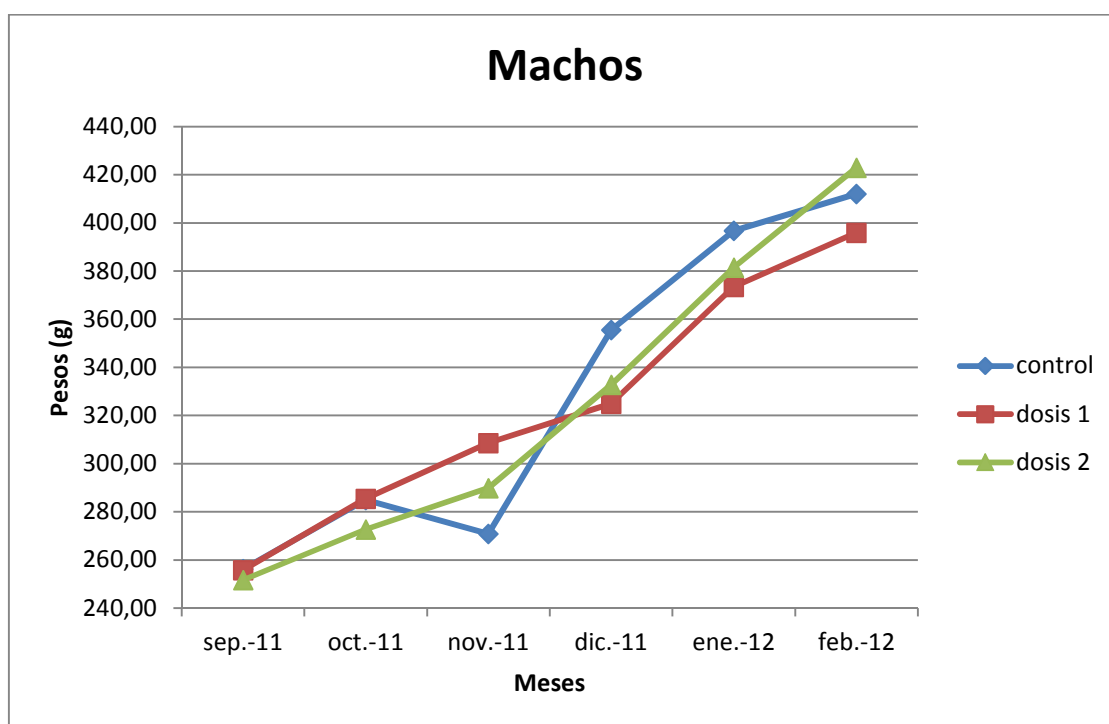
	FECHA	23/09/2011	30/09/2011	07/10/2011	21/07/2011	04/11/2011	16/12/2011	ene-12	21/02/2012
PESOS (g) CONTROL	Macho 1	247	277	331	362	297	393	446	410
	Macho 2	252	304	296	317	295	347	370	414
	Macho 3	246	258	277	234	288	337	380	
	Macho 4	238	258	286	276	242	345	391	
	Macho 5	251	264	240	253	232			
	Macho 6	264	215	274	273				
Promedio	249.67	262.67	284.00	285.83	270.80	355.50	396.75	412.00	
PESOS (g) CONTROL	Hembra 1	196	210	211	216	228	252	245	269
	Hembra 2	175	205	213	222	216	253	258	278
	Hembra 3	193	185	190	203	214	248	259	
	Hembra 4	173	203	200	198	330	256	259	
	Hembra 5	196	200	203	213	380			
	Hembra 6	191	191	211	211				
Promedio	187.33	199.00	204.67	210.50	273.60	252.25	255.25	273.50	

	FECHA	23/09/2011	30/09/2011	07/10/2011	21/10/2011	04/11/2011	16/12/2011	ene-12	21/02/2012
PESOS (g) D1	Macho 1	233	273	294	312	335	316	369	401
	Macho 2	255	283	299	311	344	329	384	391
	Macho 3	244	249	284	285	278	325	372	
	Macho 4	250	262	274	277	286	330	369	
	Macho 5	256	262	283	265	300			
	Macho 6	247	256	274	267				
	Promedio	247.50	264.17	284.67	286.17	308.60	325.00	373.50	396.00
PESOS (g) D2	Hembra 1	175	209	216	235	218	233	250	283
	Hembra 2	196	211	222	226	217	241	257	291
	Hembra 3	182	180	226	205	224	238	260	
	Hembra 4	169	196	188	232	242	246	269	
	Hembra 5	196	215	200	192	253			
	Hembra 6	204	187	195	202				
	Promedio	187.00	199.67	207.83	215.33	230.80	239.50	259.00	287.00
	FECHA	23/09/2011	30/09/2011	07/10/2011	21/10/2011	04/11/2011	16/12/2011	ene-12	21/02/2012
PESOS (g) D2	Macho 1	257	296	299	312	334	343	394	430
	Macho 2	211	240	250	267	299	343	347	416
	Macho 3	247	267	277	279	289	349	400	
	Macho 4	258	263	270	284	235	296	385	
	Macho 5	269	225	284	287	292			
	Macho 6	235	252	235	229				
	Promedio	246.17	257.17	269.17	276.33	289.80	332.75	381.50	423.00
PESOS (g) D2	Hembra 1	175	189	195	219	220	253	283	269
	Hembra 2	185	198	198	213	216	240	260	266
	Hembra 3	186	198	208	213	227	259	258	
	Hembra 4	176	182	206	214	230	238	248	
	Hembra 5	182	196	197	205	234			
	Hembra 6	185	190	192	215				
	Promedio	181.50	192.17	199.33	213.17	225.40	247.50	262.25	267.50

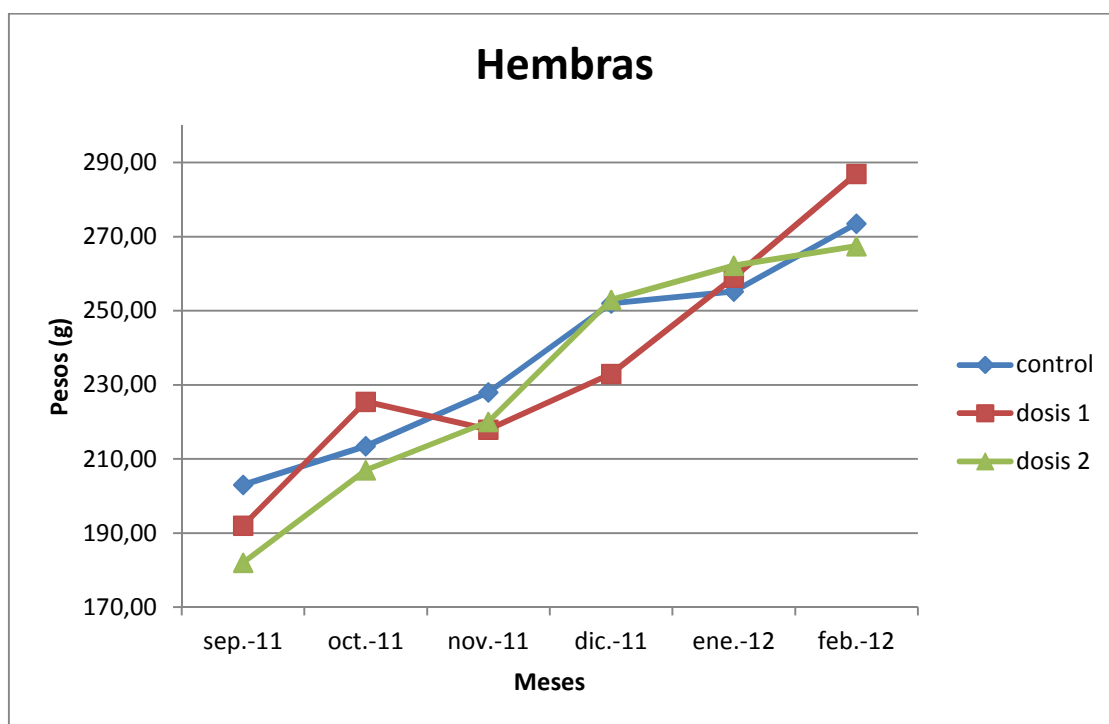
**CUADRO N° 2. DISTRIBUCIÓN DE LOS PESOS PROMEDIO DE LOS CONTROLES, DOSIS 1 Y DOSIS 2 (MACHOS Y HEMBRAS) A LO LARGO DEL ESTUDIO**

Control	sep-11	oct-11	nov-11	dic-11	ene-12	feb-12
̄ Pesos M	256.17 g	284.92 g	270.80 g	355.50 g	396.75 g	412.00 g
̄ Pesos H	203.00 g	213.50 g	228.00 g	252.00 g	255.25 g	273.50 g
Dosis 1	sep-11	oct-11	nov-11	dic-11	ene-12	feb-12
̄ Pesos M	255.83 g	285.42 g	308.60 g	325.00 g	373.50 g	396.00 g
̄ Pesos H	192.00 g	225.50 g	218.00 g	233.00 g	259.00 g	287.00 g
Dosis 2	sep-11	oct-11	nov-11	dic-11	ene-12	feb-12
̄ Pesos M	251.67 g	272.75 g	289.80 g	332.75 g	381.50 g	423.00 g
̄ Pesos H	182.00 g	207.00 g	220.00 g	253.00 g	262.25 g	267.50 g

**GRÁFICO N° 1: DISTRIBUCIÓN DE LOS PESOS PROMEDIO DE LOS CONTROLES, DOSIS 1 Y DOSIS 2 (MACHOS) A LO LARGO DEL ESTUDIO**



**GRÁFICO N° 2: DISTRIBUCIÓN DE PESOS DE LOS CONTROLES, DOSIS 1 Y DOSIS 2 (HEMBRAS) A LO LARGO DEL ESTUDIO**





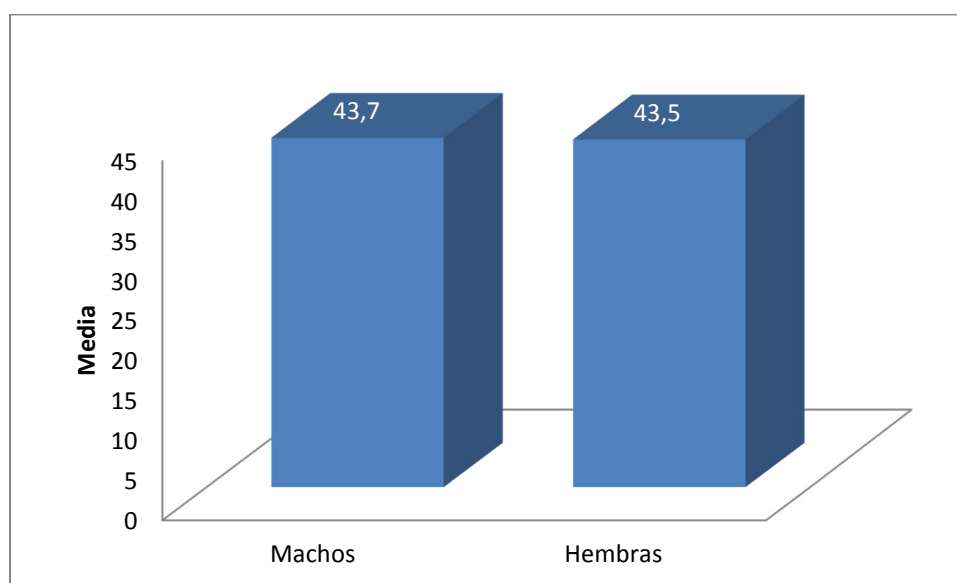
### 3.3 RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS BIOQUÍMICOS (Anexo IV)

**CUADRO N° 3. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS CONCENTRACIONES DE UREA EN SANGRE EN MACHOS Y HEMBRAS AL FINAL DEL ESTUDIO**

Sexo	Media (mg/dL)	P
Machos	43.7	0.95
Hembras	43.5	

$p=0.95 > 0.05$  no existe diferencia significativa

**GRÁFICO N° 3: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS CONCENTRACIONES DE UREA EN MACHOS Y HEMBRAS AL FINAL DEL ESTUDIO**



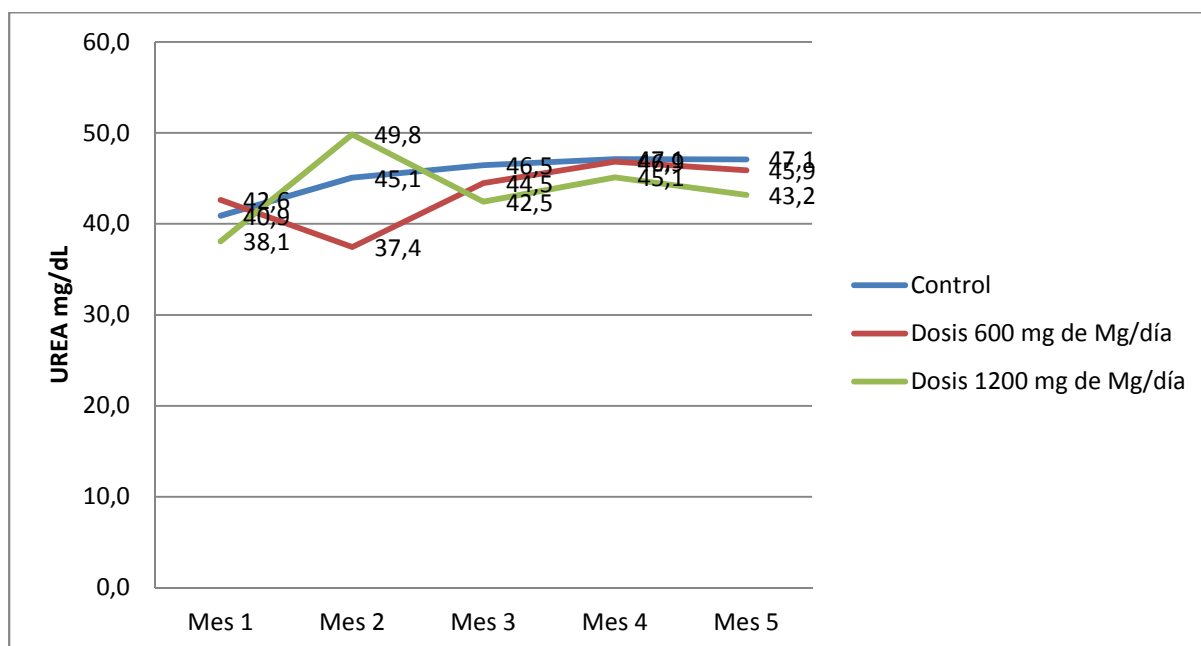
**CUADRO N° 4.COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE UREA EN SANGRE DE LOS GRUPOS  
CONTROL, DOSIS 1 Y DOSIS 2**

UREA	ANOVA				
	GRUPOS	N	Media (mg/dL)	Desviación típica	P
Mes1	Control	2	40.90	3.99	0.73
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	42.63	6.70	
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	38.08	5.42	
	Total	6	40.54	4.72	
Mes 2	Control	2	45.09	1.67	0.51
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	37.44	6.31	
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	49.83	15.33	
	Total	6	44.12	9.32	
Mes 3	Control	2	46.46	2.58	0.20
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	44.50	0.33	
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	42.45	1.29	
	Total	6	44.47	2.21	
Mes 4	Control	2	47.12	1.29	0.38
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	46.86	1.42	
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	45.12	1.29	
	Total	6	46.37	1.42	
Mes 5	Control	2	47.10	7.35	0.81
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	45.91	4.38	
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	43.18	5.93	
	Total	6	45.40	4.99	

**P<0.05 significativo; p>0.05 no significativo**

**No existe ninguna diferencia significativa para éste parámetro (ningún p<0.05).**

**GRÁFICO N° 4: COMPARACIÓN DE LOS PROMEDIOS DE CONCENTRACIÓN DE UREA EN SANGRE DE LOS GRUPOS CONTROL, DOSIS 1 Y DOSIS 2 A LO LARGO DEL ESTUDIO**

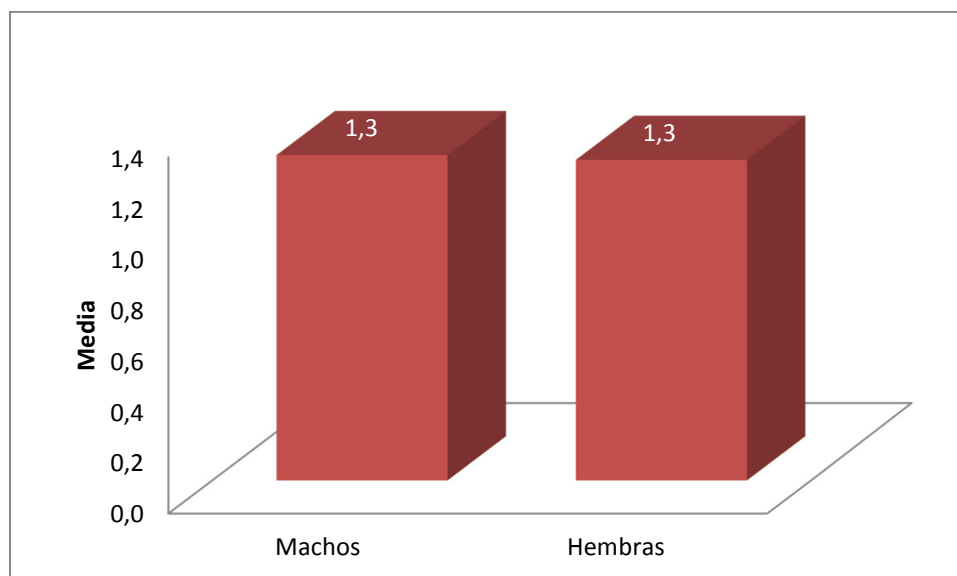


**CUADRO N° 5. COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE LAS CONCENTRACIONES DE CREATININA EN MACHOS Y HEMBRAS AL FINAL DEL ESTUDIO**

Sexo	Media (mg/dL)	P
Hembras	1.3	0.92
Machos	1.3	

$p=0.92 > 0.05$  no existe diferencia significativa

**GRÁFICO N° 5: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS CONCENTRACIONES DE CREATININA EN MACHOS Y HEMBRAS AL FINAL DEL ESTUDIO**



**CUADRO N° 6. COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE CREATININA EN SANGRE DE LOS GRUPOS CONTROL, DOSIS 1 Y DOSIS 2**

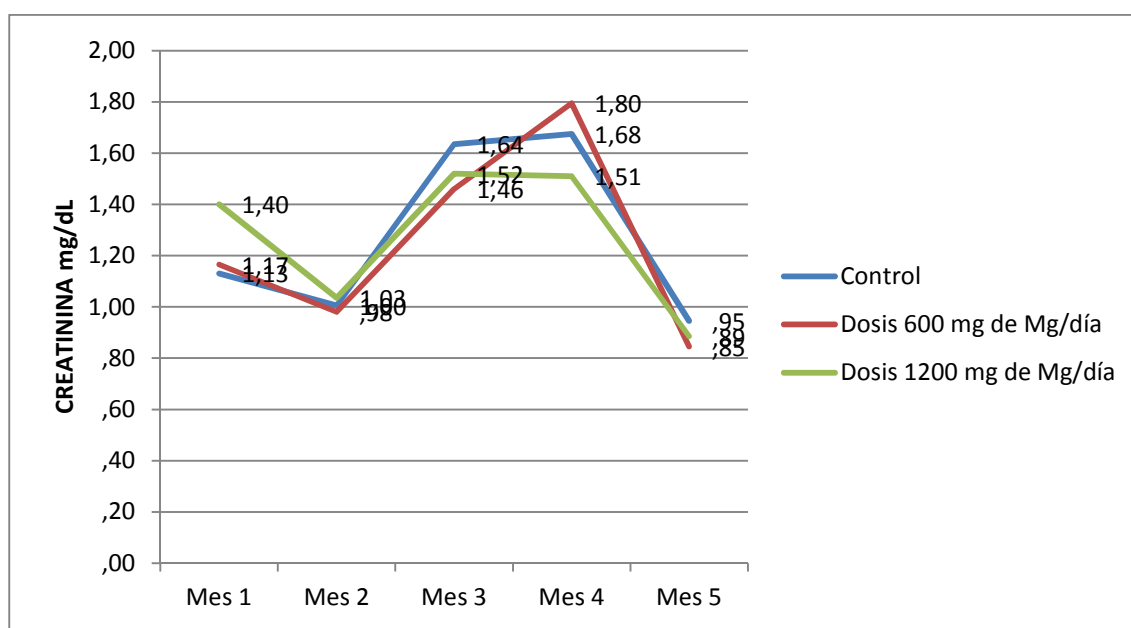
CREATININA	GRUPOS	N	Media (mg/dL)	Desviación Estándar	ANOVA	Prueba de Tukey		
					P	Control	Dosis 600 mg de Mg <sup>+2</sup> /día – D1	Dosis 1200 mg de Mg <sup>+2</sup> /día – D2
Mes 1	Control	2	1.13	0.20	0.19			
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	1.17	0.02				
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	1.40	0.06				
	Total	6	1.23	0.16				
Mes 2	Control	2	1.01	0.04	0.81			
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	0.98	0.03				
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	1.04	0.13				
	Total	6	1.01	0.07				
Mes 3	Control	2	1.64	0.02	0.50			
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	1.46	0.21				
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	1.52	0.10				
	Total	6	1.54	0.13				
Mes 4	Control	2	1.68	0.02	0.01*			0.04**
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	1.80	0.06				0.01**
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	1.51	0.01				
	Total	6	1.66	0.13				
Mes 5	Control	2	0.95	0.09	0.43			
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	0.85	0.04				
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	0.89	0.06				
	Total	6	0.89	0.07				

**P<0.05 significativo; p>0.05 no significativo**

**\*Mes 4: p=0.01<0.05 significativo**

**\*\*Tuckey: p=0.04<0.05 significativo; p=0.01<0.05 significativo. Hay relación significativa del grupo control y del D1 con respecto al grupo D2.**

**GRÁFICO N° 6: COMPARACIÓN DE LOS PROMEDIOS DE CONCENTRACIÓN DE CRETININA EN SANGRE DE LOS GRUPOS CONTROL, DOSIS 1 Y DOSIS 2 A LO LARGO DEL ESTUDIO**

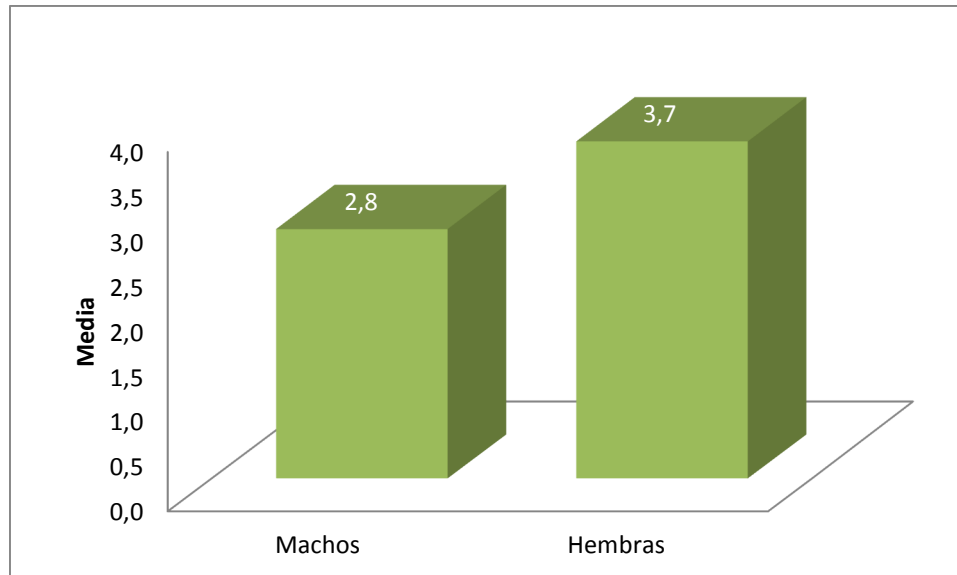


**CUADRO N° 7. COMPARACIÓN DE MEDIAS DELAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO ÚRICO EN MACHOS Y HEMBRAS AL FINAL DEL ESTUDIO**

Sexo	Media (mg/dL)	P
Machos	2.8	0.80
Hembras	3.7	

**$p=0.80 > 0.05$  no existe diferencia significativa**

**GRÁFICO N° 7: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO ÚRICO EN MACHOS Y HEMBRAS AL FINAL DEL ESTUDIO**



**CUADRO N° 8. COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO ÚRICO EN SANGRE DE LOS GRUPOS CONTROL, DOSIS 1 Y DOSIS 2**

ÁCIDO ÚRICO	GRUPOS	N	Media (mg/dL)	Desviación Estándar	ANOVA	Prueba de Tukey		
					P	Control	Dosis 600 mg de Mg <sup>+2</sup> /día – D1	Dosis 1200 mg de Mg <sup>+2</sup> /día – D2
Mes 1	Control	2	2.27	1.05	0.34			
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	1.53	0.56				
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	1.05	0.00				
	Total	6	1.61	0.76				
Mes 2	Control	2	1.72	1.37	0.81			
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	1.06	1.19				
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	1.20	0.33				
	Total	6	1.33	0.88				
Mes 3	Control	2	3.68	0.51	0.03*		0.03**	
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	5.87	0.54				0.04**
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	4.02	0.04				
	Total	6	4.52	1.10				
Mes 4	Control	2	4.64	0.25	0.35			
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	6.30	1.20				
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	5.83	1.21				
	Total	6	5.59	1.09				
Mes 5	Control	2	3.83	1.12	0.60			
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	2.30	0.78				
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	3.85	2.49				
	Total	6	3.32	1.50				

**P<0.05 significativo; p>0.05 no significativo**

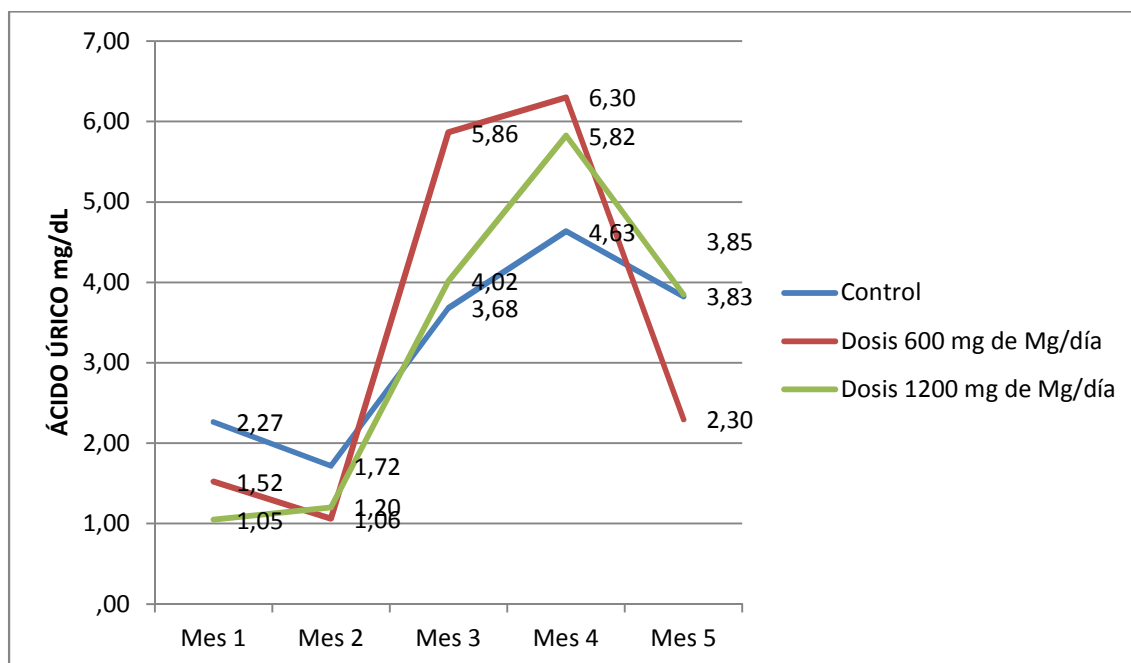
**\*Mes 3: p=0.03<0.05 significativo**

**\*\*Tuckey: p=0.03<0.05 significativo. Hay relación significativa del grupo Control con respecto al grupo D1.**

**\*\*Tuckey: p=0.04<0.05 significativo. Hay relación significativa del grupo D1 con respecto al grupo D2.**



**GRÁFICO N° 8: COMPARACIÓN DE LOS PROMEDIOS DE CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO EN SANGRE DE LOS GRUPOS CONTROL, DOSIS 1 Y DOSIS 2 A LO LARGO DEL ESTUDIO**

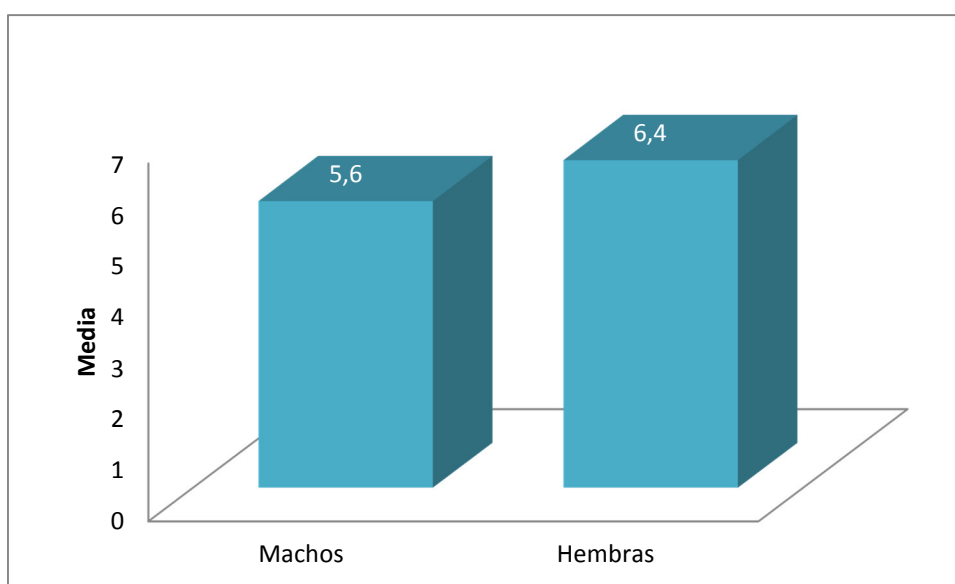


**CUADRO N° 9. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS CONCENTRACIONES DE PROTEÍNAS TOTALES EN MACHOS Y HEMBRAS AL FINAL DEL ESTUDIO**

Sexo	Media (mg/dL)	P
Machos	5.6	0.11
Hembras	6.4	

$p=0.11 > 0.05$  no existe diferencia significativa

**GRÁFICO N° 9: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS CONCENTRACIONES DE PROTEÍNAS TOTALES EN MACHOS Y HEMBRAS AL FINAL DEL ESTUDIO**



**CUADRO N° 10. COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE PROTEÍNAS TOTALES EN SANGRE  
DE LOS GRUPOS CONTROL, DOSIS 1 Y DOSIS 2**

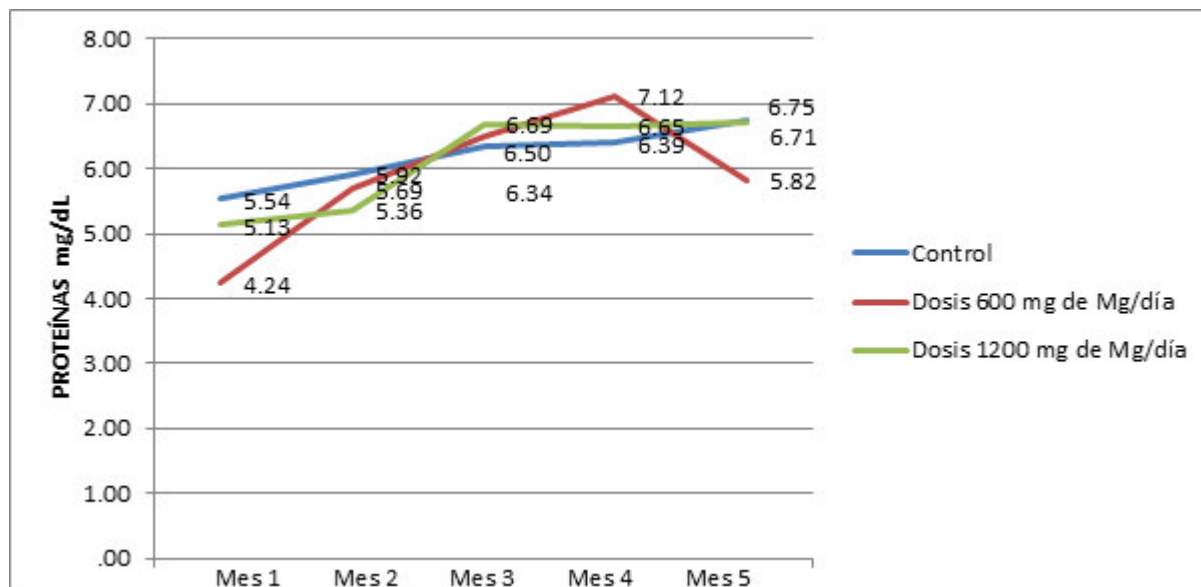
PROTEÍNAS TOTALES	GRUPOS	N	Media (mg/dL)	Desviación Estándar	ANOVA	Prueba de Tukey		
					P	Control	Dosis 600 mg de Mg <sup>+2</sup> /día – D1	Dosis 1200 mg de Mg <sup>+2</sup> /día – D2
<b>Mes 1</b>	Control	2	5.54	0.12	0.13			
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	4.24	0.76				
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	5.14	0.16				
	Total	6	4.97	0.69				
<b>Mes 2</b>	Control	2	5.92	0.00	0.02*			0.01**
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	5.69	0.09				
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	5.36	0.13				
	Total	6	5.66	0.26				
<b>Mes 3</b>	Control	2	6.34	0.93	0.85			
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	6.50	0.25				
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	6.69	0.33				
	Total	6	6.51	0.48				
<b>Mes 4</b>	Control	2	6.39	0.83	0.73			
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	7.13	0.81				
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	6.65	1.06				
	Total	6	6.72	0.78				
<b>Mes 5</b>	Control	2	6.75	0.78	0.67			
	Dosis 600 mg Mg <sup>+2</sup> /día – D1	2	5.83	0.53				
	Dosis 1200 mg Mg <sup>+2</sup> /día– D2	2	6.71	1.68				
	Total	6	6.43	0.98				

**P<0.05 significativo; p>0.05 no significativo**

**\*Mes 2: p=0.02<0.05 significativo**

**\*\*Tuckey: p=0.01<0.05 significativo. Hay relación significativa del grupo Control con respecto al grupo D2.**

**GRÁFICO N° 10: COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE PROTEÍNAS EN SANGRE DE LOS GRUPOS CONTROL, DOSIS 1 Y DOSIS 2 A LO LARGO DEL ESTUDIO**



**CUADRO N° 11. RESULTADOS DEL EXAMEN FÍSICO DE ORINA REALIZADO A LOS GRUPOS AL FINAL DEL ESTUDIO**

Muestra	Examen Físico				
	Color	Olor	Aspecto	Densidad	pH
Control hembra	Amarillo claro	Sui generis	Turbio	1	8,0
Control macho	Amarillo ámbar	Sui generis	Turbio	1	8,0
D1 hembra	Amarillo claro	Sui generis	Turbio	1.005	7,0
D1 macho	Amarillo claro	Sui generis	Turbio	1	7,0
D2 hembra	Amarillo claro	Sui generis	Turbio	1	8,0
D2 macho	Amarillo ámbar	Sui generis	Turbio	1	8,0
Valores Normales	Amarillo claro	Sui generis	Turbio	1.022 - 1.050	5.0 - 7.0

CUADRO N° 12. RESULTADOS DEL EXAMEN QUÍMICO DE ORINA REALIZADO A LOS GRUPOS AL FINAL DEL ESTUDIO

Muestra	Examen Químico						
	Albúminas	Glucosa	Pigmentos sanguíneos	Pigmentos Biliares	Urobilinógeno	Nitritos	Cetonas
Control hembra	Positivo (+)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Control macho	Positivo (+)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
D1 hembra	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
D1 macho	Positivo (+)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
D2 hembra	Positivo (+)	Negativo	Positivo (+)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
D2 macho	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Valores Normales	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

CUADRO N° 13. RESULTADOS DEL EXAMEN MICROSCÓPICO DE ORINA REALIZADO A LOS GRUPOS AL FINAL DEL ESTUDIO

Muestra	Examen Microscópico							
	Células epiteliales	Leucocitos	Hematíes	Piocitos	Bacterias	Cristales	Cilindros	Otros
Control hembra	0-1 por campo	0-1 por campo	0-1 por campo	Ausencia	Escasa	Fosfatos	Ausencia	Ausencia
Control macho	0-1 por campo	1-2 por campo	0-1 por campo	Ausencia	Escasa	Fosfatos	Ausencia	Ausencia
D1 hembra	0-1 por campo	0-1 por campo	0-1 por campo	Ausencia	Escasa	Fosfatos	Ausencia	Ausencia
D1 macho	0-1 por campo	0-1 por campo	0-1 por campo	Ausencia	Ausencia	Fosfatos	Ausencia	Ausencia
D2 hembra	0-1 por campo	0-1 por campo	8-10 por campo	Ausencia	Escasa	Fosfatos	Ausencia	Ausencia
D2 macho	0-1 por campo	0-1 por campo	0-1 por campo	Ausencia	Escasa	Fosfatos	Ausencia	Ausencia
Valores Normales	0-1 por campo	0-1 por campo	0-1 por campo	Ausencia	Ausencia	Fosfatos	Ausencia	Ausencia

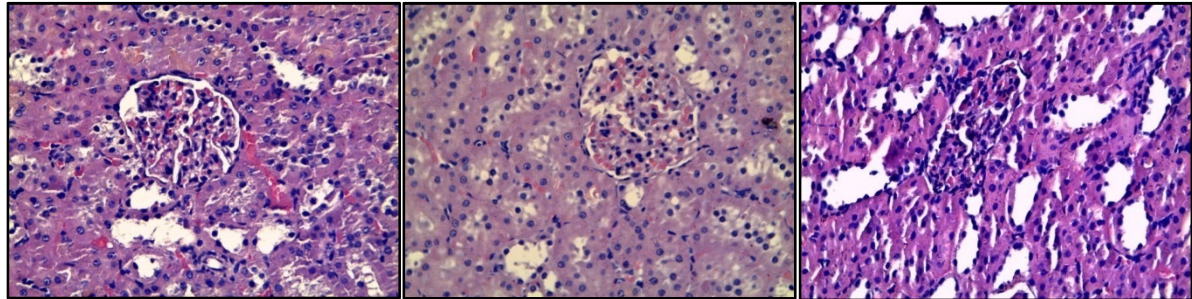
### 3.4 RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

#### Mes 1

Control

Dosis 1

Dosis 2

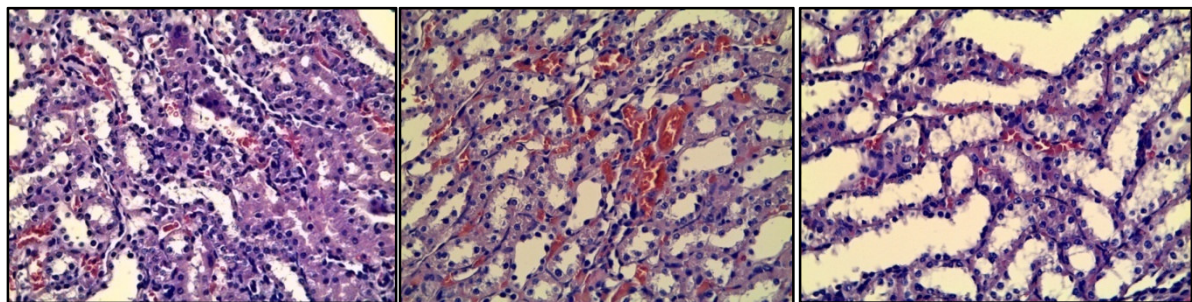


**Figura 1. Corte transversal de la corteza renal en todos los grupos en el primer mes.**

Control

Dosis 1

Dosis 2



**Figura 2. Corte transversal de la médula renal en todos los grupos en el primer mes.**

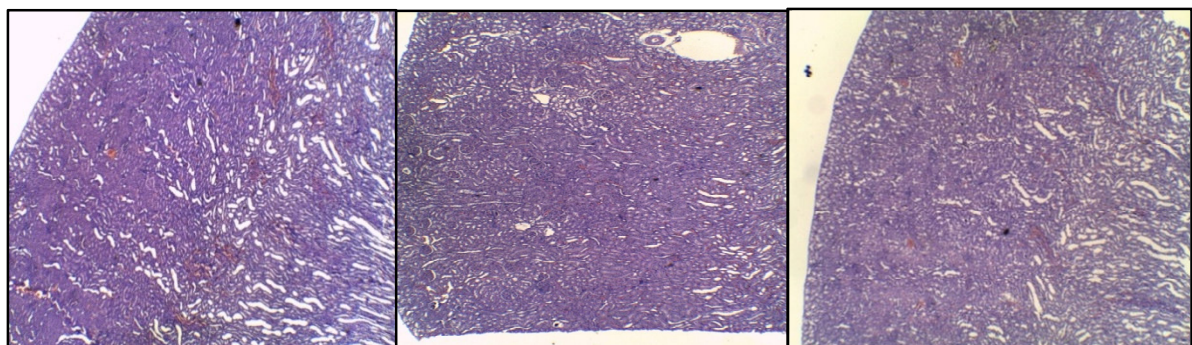
Las muestras se hallan aparentemente normales, ligeramente un poco hinchadas las células de la Dosis 1. Hay presencia de una leve nefrosis, glomérulos distendidos con congestión vascular, todos los casos siendo más notoria en la dosis 1 y 2.

#### Mes 2

Control

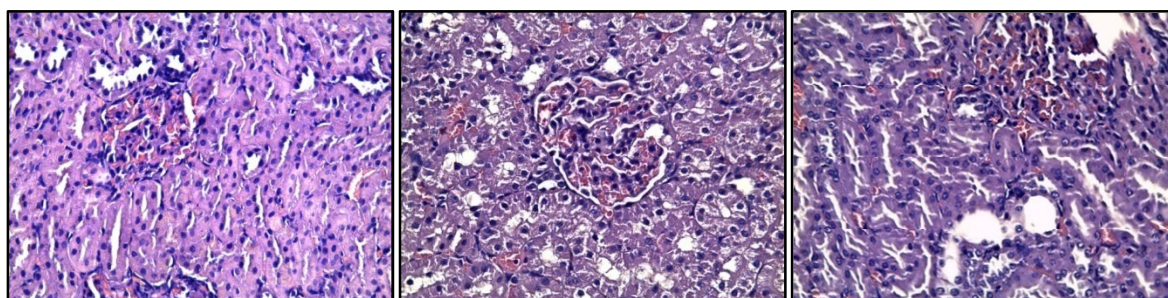
Dosis 1

Dosis 2



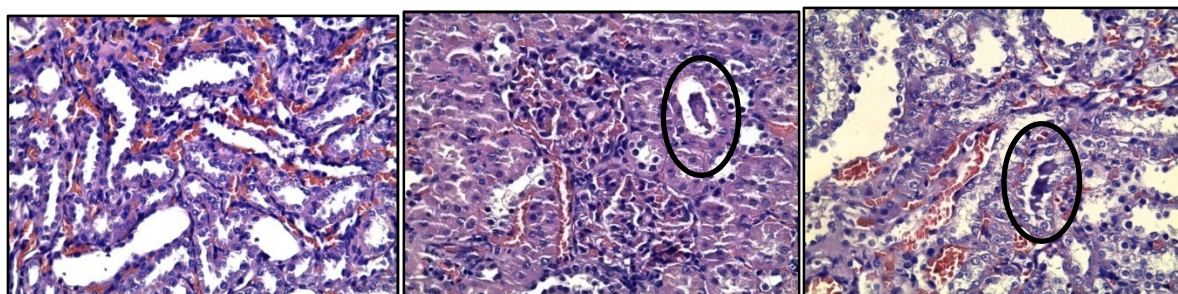
**Figura 3. Corte transversal a menor aumento de la corteza renal en todos los grupos en el segundo mes.**



**Control****Dosis 1****Dosis 2****Figura 4. Corte transversal de la corteza renal en todos los grupos en el segundo mes.**

Control: las células en la zona inferior se hallan homogéneas y de forma alargada. La zona central de un color claro se observa al glomérulo más definido se aprecia espacio de cápsula de Bowman.

D1 y D2: las células en la zona inferior se hallan en forma irregular como si se aplastaran unas a otras, además de estar hinchadas lo que nos representa un proceso inflamatorio (nefrosis posible). En estas en forma gradual se observa un glomérulo más irregular sin una presencia de cápsula de Bowman, presencia de material proteináceo en la luz de los túbulos.

**Control****Dosis 1****Dosis 2****Figura 5. Corte transversal de la médula renal en todos los grupos en el segundo mes.**

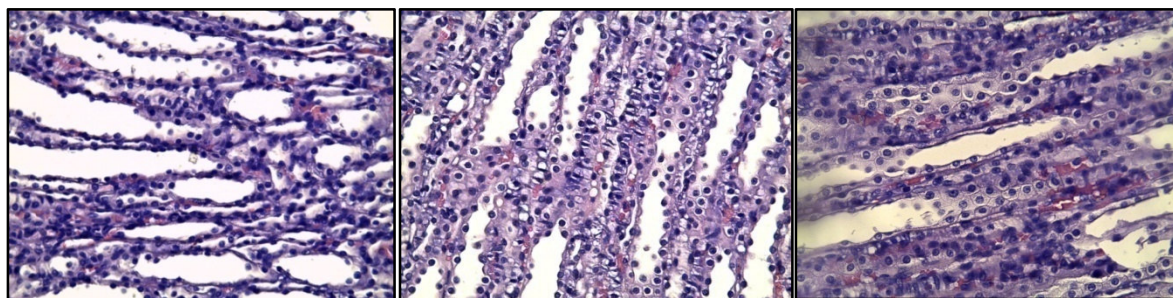
Se aprecian obstrucciones de la luz tubular a causa de una secreción de color intenso (material proteináceo).



**Control**

**Dosis 1**

**Dosis 2**



**Figura 6. Corte longitudinal – transversal de la médula renal en todos los grupos en el segundo mes**

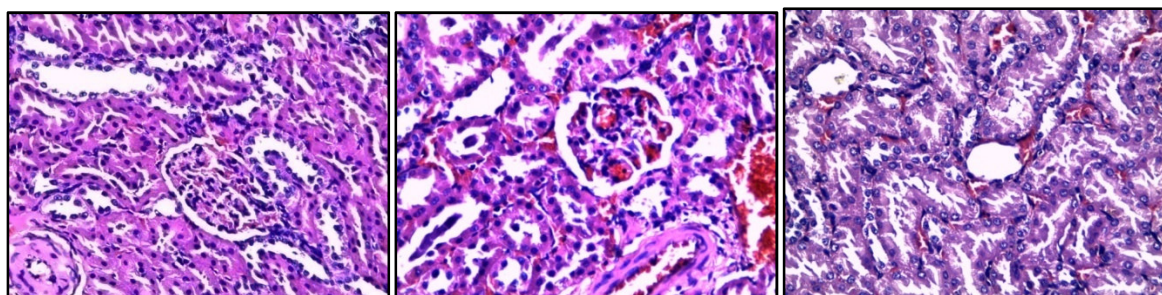
En la zona medular hay mucha más hinchazón celular en D1, y D2 a comparación del control a nivel de túbulos colectores.

**Mes 3**

**Control**

**Dosis 1**

**Dosis 2**

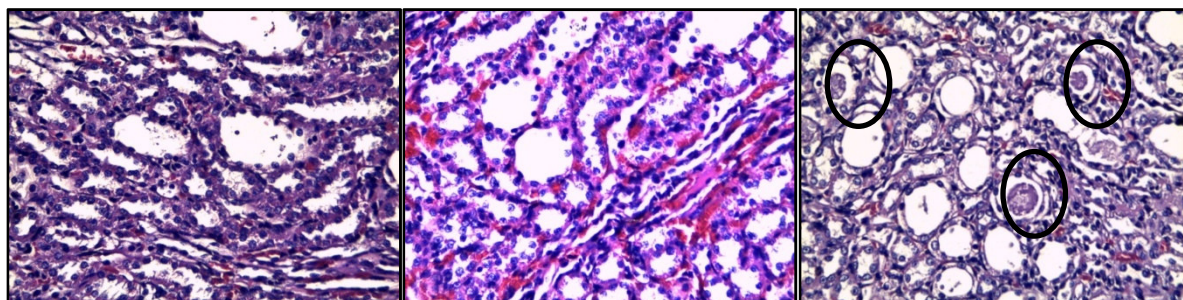


**Figura 7. Corte transversal de la corteza renal en todos los grupos en el tercer mes.**

**Control**

**Dosis 1**

**Dosis 2**



**Figura 8. Corte transversal de la médula renal en todos los grupos en el tercer mes.**

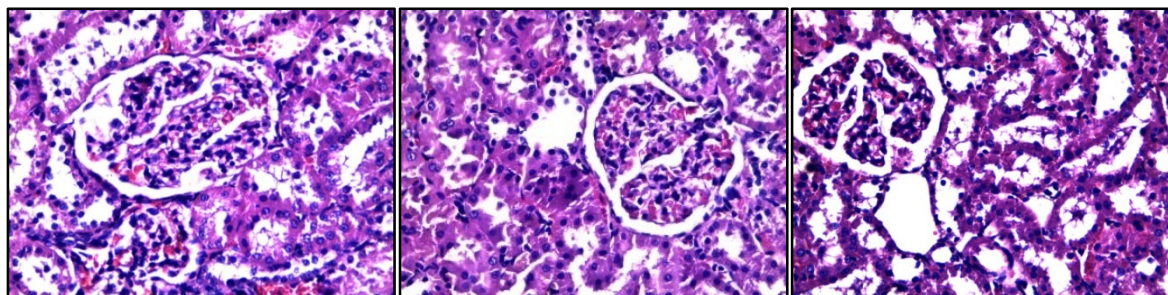
Se aprecian obstrucciones de la luz tubular a causa de una secreción de color intenso del mismo tipo que en el primer mes, en la muestra de dosis 2. Se aprecia una nefrosis leve en la muestra control; mientras que ésta es moderada en la dosis 1 y severa en el caso de la dosis 2.

**Mes 4**

**Control**

**Dosis 1**

**Dosis 2**

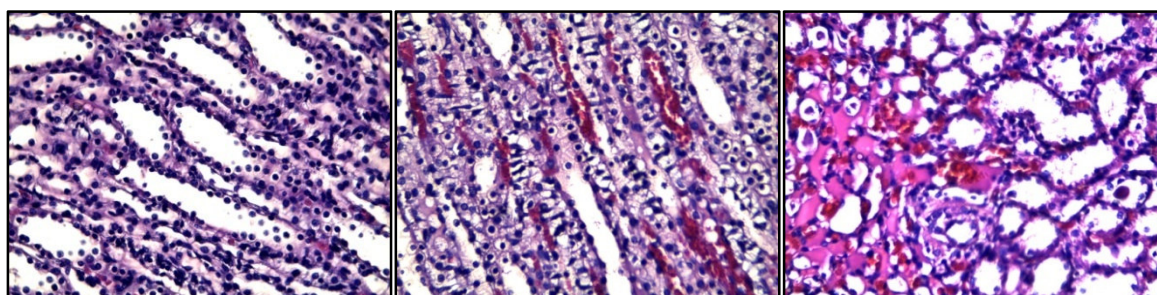


**Figura 9. Corte transversal de la corteza renal en todos los grupos en el cuarto mes.**

**Control**

**Dosis 1**

**Dosis 2**



**Figura 10. Corte transversal de la medula renal en todos los grupos en el cuarto mes.**

Hay procesos degenerativos en los túbulos renales del grupo control, D1 y D2, se observa un mayor daño incluso con la presencia de material acidófilo a nivel del túbulo túbulos proximales, siendo más severo en los grupos D1 y D2.

Por otro lado en todos los grupos hay dilatación vascular en la médula pero en los grupos D1 y D2 de este caso se aprecia hasta material acidófilo en el intersticio.

Recordemos que al iniciar el estudio los animales se encontraban aparentemente normales, procesos nefróticos leves.

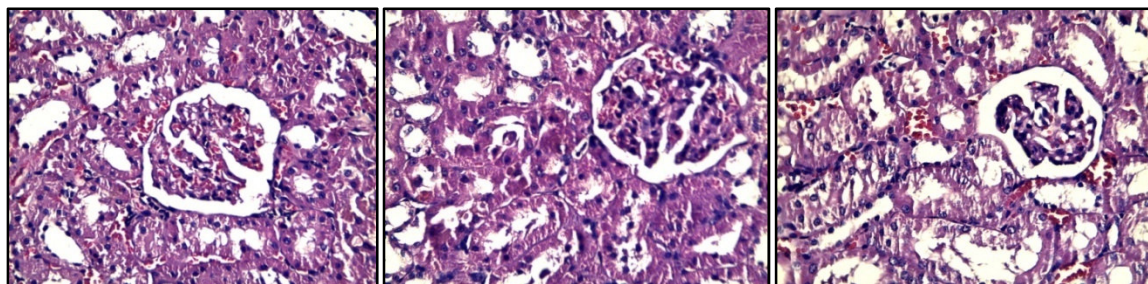


Mes 5

Control

Dosis 1

Dosis 2

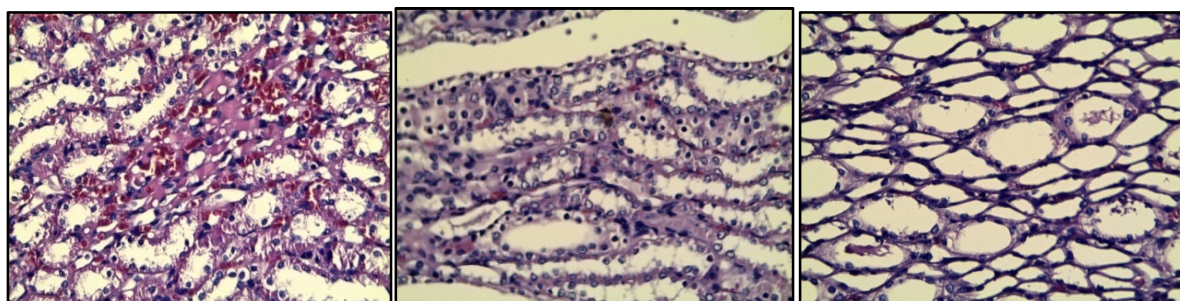


**Figura 11. Corte transversal de la corteza renal en todos los grupos en el quinto mes.**

Control

Dosis 1

Dosis 2



**Figura 12. Corte transversal de la medula renal en todos los grupos en el quinto mes.**

En todos se observa cambios degenerativos (nefrosis) pero la presencia de sustancia hialina en la luz de los túbulos proximales y colectores sólo en el D2 y en menor cantidad en la D1. Además cabe mencionar que se aprecia presencia de colágeno en la zona del intersticio medular.

Complementando la información presentada en el cuadro N°10, se observó en el grupo dosis 1 y dosis 2 tumefacción celular, con vacuolización de los túbulos proximales (grupo dosis 1). A nivel de la rama gruesa ascendente del asa de Henle y la primera porción del túbulo contorneado distal, las células están tumefactas. Se observó en ambos grupos material proteináceo en la luz tubular, con pequeñas gotas acidófilas y a nivel medular se observa que el epitelio de los túbulos colectores está tumefacto obliterando la luz.

**CUADRO N° 14. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS (Anexo V)**

Mes	Grupo	Nefrosis	Nivel de la tumefacción	Material proteináceo	Nivel	Colágeno	Nivel	Otras observaciones
<b>Mes 1</b>	<b>Control</b>	Leve	Túbulos proximales	No	-	No	-	Glomérulos distendidos con congestión vascular.
	<b>Dosis 1</b>	Moderada	Túbulos proximales	Si	Túbulos proximales	No	-	Glomérulos distendidos con congestión vascular. Tumefacción en tubules colectores.
	<b>Dosis 2</b>	Moderada	Túbulos proximales	Si	Túbulos proximales	No	-	Glomérulos distendidos con congestión vascular. Tumefacción en tubules colectores.
<b>Mes 2</b>	<b>Control</b>	Leve	Túbulos proximales	No	-	No	-	Hemorragia en dos de las muestras analizadas.
	<b>Dosis 1</b>	Moderada	Túbulos proximales y colectores	No	-	No	-	Dilatación vascular
	<b>Dosis 2</b>	Moderada	Túbulos proximales y colectores	No	-	No	-	Dilatación vascular
<b>Mes 3</b>	<b>Control</b>	Leve	Túbulos proximales	Si	Túbulos proximales	No	-	Sólo dos de las muestras presentaron material proteináceo.
	<b>Dosis 1</b>	Moderada	Túbulos proximales	Si	Túbulos proximales	No	-	Todas las muestras presentaron material proteináceo.
	<b>Dosis 2</b>	Severa	Túbulos proximales	Si	Túbulos proximales	No	-	Todas las muestras presentaron material proteináceo.
<b>Mes 4</b>	<b>Control</b>	Leve	Túbulos proximales	Si	Túbulos proximales	No	-	Solo una de las muestras presentó material proteináceo.
	<b>Dosis 1</b>	Moderada	Túbulos proximales	Si	Túbulos proximales	No	-	Todas las muestras presentaron material proteináceo, entre las zonas cortical y medular. Presencia de linfocitos alrededor de éste en dos de las muestras.
	<b>Dosis 2</b>	Severa	Túbulos proximales	Si	Túbulos proximales	No	-	Todas las muestras presentaron material proteináceo entre la zona cortical y medular.
<b>Mes 5</b>	<b>Control</b>	Leve	Túbulos proximales	Si	Túbulos proximales	No	-	Solo una de las muestras presentó material proteináceo.
	<b>Dosis 1</b>	Moderada	Túbulos proximales	Si	Túbulos proximales	Si	Intersticio medular	Todas las muestras presentaron material proteináceo a nivel tubular con dilatación de los mismos.
	<b>Dosis 2</b>	Severa	Túbulos proximales	Si	Túbulos proximales	Si	Intersticio medular	Todas las muestras presentaron material proteináceo a nivel tubular con dilatación de los mismos.

#### IV. DISCUSIÓN

Este estudio, realizado en el bioterio de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, describe las condiciones de trabajo y los riesgos de la exposición por vía oral de sales de Magnesio (cloruro de Magnesio), de las ratas albinas de la especie *Rattus norvegicus* cepa Holtzman. Según los resultados mostrados, la variación de los pesos es mínima según cuadro N°1 y N°2, y las gráficas N°1 y N°2, por lo que se aprecia que a medida que pasa el tiempo hay un crecimiento uniforme de los animales.

Los efectos de hiporreflexia, letargia y somnolencia se pueden apreciar cuando hay una elevada concentración de magnesio a nivel sérico o en una hipermagnesemia leve (2 a 3 mmol/L) <sup>(34)</sup>. Estos son sólo efectos secundarios del consumo por vía oral de cloruro de magnesio, los cuales no es de mayor gravedad ya que no hay apreciación alguna de toxicidad neuromuscular y otros síntomas que se hayan podido observar durante el estudio.

Con respecto a todos los análisis realizados a los grupos se aprecia que no hay una variación con un nivel de significancia entre los sexos, para que los resultados predominen sobre uno u otro sexo ( $p < 0.05$ ), por la comparación de medias como se puede observar en los cuadros N°3, N°5, N°7 y N°9. Esto nos permite tomar muestras de machos y hembras indistintamente para los cálculos de análisis de varianza (ANOVA) entre grupos control, dosis 1 y dosis 2. Ello es similar a los estudios presentados por Lagarto y col. en el cual se evidencia que no hay ninguna diferencia significativa entre los valores obtenidos de la bioquímica sanguínea entre sexos. <sup>(14)</sup>

Según los resultados mostrados en el cuadro N° 4, se observa que las medias de concentración de Urea en sangre del grupo de control, Dosis 1 y Dosis 2 son estadísticamente similares no significativo ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, el promedio ideal para ratas de la especie *Rattus norvegicus* es de 34 mg de urea/dL de plasma <sup>(35)</sup>, lo que nos indica que los valores de las medias en todos los grupos se hallan ligeramente elevados pues en

casi todos los casos estos valores sobrepasan los 40 mg de urea/dL de plasma. Una elevación de las concentraciones séricas de urea nos daría indicio de un catabolismo más acelerado del nitrógeno de los aminoácidos o también de un metabolismo del amoníaco renal, pues los riñones vierten la urea devuelta a la sangre cuando hay un exceso de esta a nivel de las arterias renales que le impidiese realizar una adecuada depuración de dicha sustancia. <sup>(38)</sup> Por otra parte, un aumento de la concentración de Urea en sangre induce a una diuresis osmótica para eliminar el exceso de magnesio y otros iones que se haya en sangre, tal como se describe en el artículo de la Dra. Pilar Aranda. <sup>(17)</sup>

Según los resultados mostrados en el cuadro N° 6, se observa que las medias de concentración de Creatinina durante los meses de estudio en sangre del grupo de control, Dosis 1 y Dosis 2 son estadísticamente similares con un nivel de significancia irrelevante ( $p < 0.05$ ). Con excepción del mes 4 en el cual se evidencia una marcada diferencia significativa entre las medias del grupo control con respecto a la dosis 2 y de la dosis 1 con respecto a la dosis 2. Observando el gráfico N°6 se puede apreciar que hay un aumento progresivo de las concentraciones de creatinina en todos los grupos hasta el mes 4, pues en el mes 5 hay una caída de dicha concentración en los tres grupos. Y, a su vez, se evidencia que la dosis 1 y la dosis 2 en comparación con el grupo control son las que más variabilidad presentan, por lo que hay una relación entre las concentraciones de creatinina sérica y la ingesta de magnesio, es decir, que a mayor ingesta de magnesio mayor es la concentración de creatinina en sangre. Por otro lado, de los resultados obtenidos en el mes 3 y sobre todo en el mes 4 todos los grupos superan el límite permitido (0.4 – 1.5 mg creatinina /dL de suero) <sup>(35)</sup>. Siendo la dosis 1 la que ha presentado mayores niveles de creatinina (1.80 mg creatinina/dL de suero). Ello puede tener relación con el síndrome nefrótico, pues de acuerdo con las investigaciones de Schlesinger y col. nos advierte que un aumento de la creatinina sérica y de la urea a consecuencia pueden ser indicios que se relacionen con una nefrosis. <sup>(36)</sup>

<sup>37)</sup> En comparación con el estudio realizado por Lagarto y col. los niveles de urea y creatinina

sérica se mantuvieron dentro de los rangos permitidos, y sin mostrar diferencias significativas en ninguno de los grupos de estudio y el control. <sup>(14)</sup>

Según los resultados mostrados en el cuadro N° 8, se observa que las medias de concentración de Ácido Úrico durante los meses de estudio en sangre del grupo de control, Dosis 1 y Dosis 2 son estadísticamente similares con un nivel de significancia irrelevante ( $p < 0.05$ ). Con excepción del mes 3 en el cual se evidencia una marcada diferencia significativa entre las medias del grupo control con respecto a la dosis 1 y de la dosis 1 con respecto a la dosis 2. Observando el gráfico N°8 se puede apreciar que hay un aumento progresivo de las concentraciones de ácido úrico en todos los grupos hasta el mes 4, pues en el mes 5 hay una caída de dicha concentración en los tres grupos. También, se evidencia que la dosis 1 y la dosis 2 en comparación con el grupo control son las que más variabilidad presentan, pero por sobre todo la dosis 1, por lo que hay una relación entre la concentración de ácido úrico sérico y dicha dosis de ingesta de magnesio. Por otro lado, de los resultados obtenidos en ninguno de los grupos superan el límite permitido (3.4 mg ácido úrico/dL de suero) <sup>(35)</sup>. Ello puede deberse al tipo de dieta que presentan los animales de experimentación, la cual es nula en cuanto a carnes que son las principales aportantes de nucleótidos purínicos por lo que la concentración de ácido úrico a nivel sérico es baja. <sup>(38)</sup>

Según los resultados mostrados en el cuadro N° 10, se observa que las medias de concentración de Proteínas Totales durante los meses de estudio en sangre del grupo de control, Dosis 1 y Dosis 2 son estadísticamente similares con un nivel de significancia irrelevante ( $p < 0.05$ ). Con excepción del mes 2 en el cual se evidencia una marcada diferencia significativa entre las medias del grupo control con respecto a la dosis 2. Observando el gráfico N°6 se puede apreciar que hay un aumento progresivo de las concentraciones de proteínas totales en todos los grupos siendo la mayor en aumento de la dosis 2, por lo que hay una relación entre la concentración de proteínas totales en sangre y la ingesta de

magnesio a la concentración de la dosis 2, es decir, que a mayor ingesta de magnesio mayor es la concentración de proteínas sanguíneas. No obstante, los resultados obtenidos en el mes 1 y 2 todos los grupos se hayan por debajo el límite permitido (6.07 – 8.40 g proteínas/dL de sangre) <sup>(35)</sup>. Siendo la dosis 1 la que ha presentado en promedio menores concentraciones de proteínas séricas, e inclusive los niveles de proteínas son bajos en el último mes (5.83 g proteínas / dL de sangre). De acuerdo a los estudios de Quamme, el 70% de magnesio es ultrafiltrable y se elimina por vía renal; la fracción de magnesio que no se llega a filtrar a nivel de los riñones cuando está en exceso en el organismo se haya ligado a proteínas no ultra-filtrables, ello puede darnos una explicación de la elevación de proteínas a nivel sérico.<sup>(24)</sup> Pues de no ser así, entraría en contradicción con lo expresado por diferentes autores con respecto a que uno de los signos para determinar fallo renal es una disminución de las concentraciones de proteínas plasmáticas acompañada de proteinuria. <sup>(36, 38, 39, 40)</sup> Lo que si se está presentando posiblemente en el grupo de dosis 1, por tener bajos niveles de concentración de proteínas séricas. Estaría éste dato entrando en contradicción con el estudio realizado por Lagarto y col. donde las proteínas totales a nivel sérico se mantuvieron dentro de los rangos permitidos, y sin mostrar diferencias significativas en ninguno de los grupos de estudio y el control. <sup>(14)</sup>

Con respecto al análisis de orina, se presentó en todos los grupos presencia de albúmina en orina; y en el grupo de dosis 2 se presentó hematuria. La alcalinización de la orina puede deberse al consumo las sales de magnesio los cuales se excretan por la orina misma. Con respecto a la mayoría de parámetros bioquímicos todos los grupos estuvieron dentro de lo normal. En comparación con los estudios realizados por Lagarto y col. ciertos grupos de su estudio presentaron hematíes y leucocitos en sus muestras de orina y sus parámetros bioquímicos se hallaron dentro de los límites permitidos. <sup>(14)</sup> Por lo que existe cierta similitud entre los datos obtenidos con los pertenecientes a dicho estudio.



Finalmente, de acuerdo a los Análisis Histopatológicos realizados se diagnosticaron en todos los casos procesos nefróticos siendo leve en el caso del grupo control, y moderados y severos en los grupos de Dosis 1 y Dosis 2 respectivamente. Los pacientes sanos pueden generar un tipo de nefrosis leve (fisiológica) a causa de una dieta inadecuada o en situaciones de estrés (como por ejemplo en el momento del sacrificio del animal). No obstante, los riñones pueden manejar bien éste tipo de situaciones sin llegar a un plano mórbido severo. Si bien la capacidad de adaptación de los riñones ante sobrecargas breves y ocasionales es muy grande, cuando estas son continuas, su capacidad funcional puede llegar a agotarse, fracasando en su función y respondiendo con cierto tipo de procesos patológicos. <sup>(27)</sup> Se hallaron tumefacciones a nivel de los túbulos proximales, presencia de material proteináceo en la luz tubular y en el último mes presencia de colágeno en la zona de intersticio medular. Ello nos indica que como producto de un daño a nivel tubular generen cambios estructurales como la tumefacción celular, desprendimiento celular, activación de proteasas que dañen las membranas y desprendan proteínas a la luz del túbulo y remodelaciones celulares que generen la presencia de colágeno en el intersticio medular. <sup>(40)</sup> En un modelo experimental de nefropatía crónica por administración de ciclosporina en ratas realizado por Thomas SE y col. se hallaron lesiones tubulares con proliferación tubular e intersticial y depósito de matriz extracelular en el intersticio celular renal <sup>(41)</sup> similar al cuadro que se presentó en ésta investigación. En el estudio de Lagarto y col. las dosis de Calcitol administradas en los grupos tratados con el suplemento nutricional generaron a nivel renal procesos de nefritis, nefrosis y alteraciones vasculares con presencia de hematíes. <sup>(14)</sup> Por lo que ambos estudios tienen en común que se generan procesos de degeneración celular a nivel renal. Cabe señalar que un estudio que se realice por un periodo mucho más amplio podría conllevar a demostrar insuficiencia renal crónica.

## V. CONCLUSIONES

Las conclusiones encontradas en el presente estudio son las siguientes:

1. Se demuestra daño renal degenerativo de tipo nefrosis moderada y severa a consecuencia de la administración de cloruro de magnesio en dosis de 600 mg  $Mg^{+2}$ /día y de 1200 mg  $Mg^{+2}$ /día respectivamente, acompañado de material proteináceo en la luz tubular.
2. La concentración máxima encontrada de urea en sangre del grupo experimental Dosis 1 (600 mg  $Mg^{+2}$ /día) es de 46.86 mg urea/L plasma en promedio (n=2) y del grupo experimental Dosis 2 (1200 mg  $Mg^{+2}$ /día) es de 46.86 mg urea/L plasma en promedio (n=2).
3. La concentración máxima encontrada de creatinina en sangre del grupo experimental Dosis 1 (600 mg  $Mg^{+2}$ /día) es de 1.80 mg creatinina/dL suero y del grupo experimental Dosis 2 (1200 mg  $Mg^{+2}$ /día) es de 1.52 mg creatinina/dL suero.
4. La concentración máxima encontrada de ácido úrico en sangre del grupo experimental Dosis 1 (600 mg  $Mg^{+2}$ /día) es de 6.30 mg ácido úrico/dL suero en promedio (n=2) y del grupo experimental Dosis 2 (1200 mg  $Mg^{+2}$ /día) es de 5.83 mg ácido úrico/dL suero en promedio (n=2).
5. La concentración mínima de proteínas totales en sangre del grupo experimental Dosis 1 (600 mg  $Mg^{+2}$ /día) es de 4.24 g proteínas/dL sangre en promedio (n=2) y del grupo experimental Dosis 2 (1200 mg  $Mg^{+2}$ /día) es de 5.14 g proteínas/dL sangre en promedio (n=2).

6. Finalmente, se concluye que la evaluación realizada después de administrar cloruro de magnesio durante 5 meses determinó daño estructural y funcional a nivel renal.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio toxicológico en animales de experimentación a los cuales se les administre por vía oral una dosis de 600 mg  $Mg^{+2}$ /día evaluando las concentraciones de proteínas totales, creatinina y urea en sangre por un periodo de tiempo mucho más prolongado.
- Realizar un estudio toxicológico en animales de experimentación a los cuales se les administre por vía oral tanto una dosis de 600 mg  $Mg^{+2}$ /día como una dosis de 1200 mg  $Mg^{+2}$ /día, evaluando las concentraciones de proteínas, albúminas, cuerpos cetónicos, número de hematíes y número de leucocitos presentes en la orina. Debido a que esos parámetros no se evaluaron en éste estudio y lo complementarían.
- Realizar un estudio toxicológico en animales de experimentación a los cuales se les administre por vía oral tanto una dosis de 600 mg  $Mg^{+2}$ /día como una dosis de 1200 mg  $Mg^{+2}$ /día, y evaluar histológicamente al riñón a nivel de túbulos proximales, túbulos colectores e intersticio medular por un periodo de tiempo más prolongado.
- Evaluar las concentraciones de magnesio que se hallan a nivel sérico y urinario con la finalidad de establecer mejor la correlación entre magnesio con problemas renales.
- Realizar estudios toxicológicos de ingesta crónica de magnesio y su relación con la homeostasis del calcio.
- Prevenir a la población que la ingesta excesiva de suplementos de magnesio es dañina para la salud y que ésta debe ser supervisada por un nutricionista o un médico.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Salcedo La Torre, E. Magnesemia en Nefropatías. Tesis para optar al Grado de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima, 1961.
2. Sotomayor Camayo, J. Toxicidad Aguda y Dosis Letal del Hexafluorosilicato de Magnesio en Ratas. Revista de Odontología Sanmarquina. 2001; 1 (7): 9 -12.
3. Wagner Grau, P. Comportamiento Renal del Magnesio y su Implicación en la Regulación de la Presión Arterial. Acta Médica Peruana 2002; 19 (4): 15 – 29.
4. Balbuena Oré, L. E. Acción del sulfato de magnesio sobre el inicio de acción y vida medio del rocuronio en pacientes intervenidos con anestesia general del Hospital Arzobispo Loayza. Tesis de la Facultad de Medicina Humana. UNMSM. Lima, 2003.
5. Benitez López, E. O. Incidencia de eclampsia en pacientes diagnosticadas como preeclampsia severa que recibieron tratamiento con sulfato de magnesio en el Hospital San Bartolomé. Tesis de la Facultad de Medicina Humana. UNMSM. Lima, 2005.
6. Greemberg D, Tufts E. The effect of magnesium deprivation on renal function. American Journal of Physiology. 1958; 121: 424 – 430.
7. Hess R, McYntire Y. Histochemical change in rat kidney in magnesium deprivation. British Journal of Experimental Pathology. 1959; 40: 80 – 86.
8. Quamme GA, Dirks J. Magnesium: Cellular and renal exchanges in: DW Seldin, G. Giebish eds. Physiology and Pathphysiology, New York, Raven Press 1985, 1269 -1280.
9. Dai Lj, Quamme GA. Presence of a novel influx pathway for  $Mg^{++}$  in the MDCK cells. Am JPhysiol, 1990; 259: C521- C525.
10. Rouffignac C De, Di Stefano A, Wittner M et al. Consequences of differential effects of ADH and other peptides hormones on thick ascending limb of mammalian kidney. Am JPhysiol, 1991 260 R1023-R1035.

11. Brown E. M. y col. Characterization of an extracellular  $\text{Ca}^{++}$  -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*, 1993; 366: 575 - 580.
12. Quamme GA, Rouffignac C De. Transport of magnesium in renal epithelial cells. In: Nj Birch ed. *Magnesium and the cell*, London, Academic Press, 1993, 235-262.
13. Wittner M, Desfleurs E, Pajaud Set al. Calcium and magnesium: low passive permeability and tubular secretion in the mouse medullary thick ascending limb of Henle's loop (MTAL) *J Membr. Biol*, 1996; 153: 27-35.
14. Lagarto A, Tillán J, Bueno V y col. Estudio Toxicológico del Calcidol, un Suplemento Nutricional de Calcio y Magnesio. Departamento de Investigaciones Biológicas. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, CIDEM, La Habana, Cuba. *Revista de Toxicología*.2002; 19 (1): 35 – 40.
15. Choppin G. Química. 20° Edición. Publicaciones Cultural S. A. México D. F. 1971.
16. Gennaro AR, Der Marderosian AH, Hanson GR, Medwick T. Remington Farmacia. 20° Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires 2003.
17. Aranda P, Planells E, Llopis J. Magnesio. Departamento de Fisiología e Instituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos. Facultad de Farmacia. Campus de Cartuja. Universidad de Granada. *Ars Pharmaceutica*, 2000; 41 (1): 91 – 100.
18. Arguedas MA, Albarra CA. Intoxicación por Magnesio (Revisión Bibliográfica a Propósito de un Caso). *Revista Médica de Costa Rica*. 1996; 487: 83-85.
19. Izaguirre V, Zavaleta AI. Canales de Calcio Voltaje Dependientes. *Ciencia e Investigación*. 2008; 1 (1): 20-24.
20. Guyton, A., Hall, J. Tratado de Fisiología Médica. 11ª Edición. Editorial Elsevier. Madrid 2004.
21. Siegel GJ, MD. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. Seventh Edition. Elsevier Academic Press. American Society for Neurochemistry. Massachusetts 2006.

22. Grosero RK. Magnesium deficiency: A cause of heterogeneous disease in humans. La deficiencia de magnesio: La causa de enfermedad heterogénea en los seres humanos. J Bone Miner Res 1998; 13:749-58.
23. Quamme GA, Rouffignac C De. Epithelial Magnesium Transport and Regulation by the Kidney. Frontiers in Bioscience 5, d694-711, New York, 2000.
24. Quamme GA. Renal magnesium handling: New insights in understanding old problems. Kidney International. 1997; 52: 1180 – 1195.
25. Long JD, Gordon R, Quamme GA ET. Col. Magnesium Transport in the Renal Distal Convuluted Tubule. Department of Medicine of British Columbia University and Department of Pathobiology of Toronto University. Physiological Reviews. 2001; 8(1): 43 – 55.
26. Todd Alexander R, Hoenderop JG, Bindels RJ. Molecular Determinants of Magnesium Homeostasis. Journal of American Society in Nephrology. 2008; 19: 1451 – 1458.
27. Goldman Bennet, C. Tratado de Medicina Interna. 21ª Edición. McGraw Hill. Madrid. 2002.
28. MASSEY P B.: Dietary Supplements. Medical Clinics of North America, Houston 2002.
29. Directrices de la OCDE para los ensayos de productos químicos. N º 453. Documento Guía para el diseño y la realización de estudios combinados de toxicidad subcrónica y crónica / estudios de carcinogenicidad, 2009.
30. Directrices de la OCDE para los ensayos de productos químicos. N º 452, V. 8. Documento Guía para el diseño y la realización de estudios de toxicidad crónica, 2008.
31. Griffith JQ, Farris EJ. The Rat in Laboratory Investigation. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1942
32. Guerci, A. Laboratorio. Métodos de Análisis Clínicos y su Interpretación. 3º Edición. Editorial “el Ateneo”. Buenos Aires, 1985.

33. Manual Uritest Series Urine Reagent Strips. Uritest 10G/11G: used for Uritest-50, URIT-50, Uritest-500B, URIT-500 series and URIT-30 urine analyzer. Rev. 201106-1 (20110000).
34. Lowenthal DT. Clinical Pharmacology of Magnesium Chloride. In: Giles TD, Seelig MS, Eds. The Role of Magnesium Chloride Therapy in Clinical Practice. Clifton, NJ: Oxford Health Care; 1998.
35. Bolant B, Calvo MA & col. Hematología y Bioquímica Clínica de la Rata. Centro de Investigación. Hospital General Universidad de Valencia. Research in Surgery, Suplemento 4, Valencia – España, 1990.
36. Schlesinger P, Sultz H, Mosher W et al. The nephrotic syndrome. Its incidence and implications for the community. American Journal of Children Disease 1968; 116: 623-632.
37. Orth S, Ritz E. The Nephrotic Syndrome. N Engl J Med 1998; 338: 1202-1211.
38. Martin DW, Mayes PA, Rodwell VW. Bioquímica de Harper. 8ª Edición. Editorial El Manual Moderno. México DF, 1984.
39. Sellarés V. Manual de Nefrología Clínica, Diálisis y Trasplante Renal. Harcourt Brace. Madrid 1998.
40. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins & Cotran - Patología Estructural y Funcional. Séptima Edición. Editorial Elsevier. Madrid - España, 2005; PP. 906 – 938.
41. Thomas SE, Andoh TF, Pichler RH, Shanklnad SJ, Couser WG and col. Accelerated apoptosis characterizes fibrosis. Kidney Int. 1998; 58: 897 – 908.



## **VIII.**

## **ANEXOS**

# DRAFT OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

## Test Guideline 452: Chronic Toxicity Studies

### INTRODUCTION

1. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals are periodically reviewed in the light of scientific progress, changing assessment practices and animal welfare considerations. The original Guideline 452 was adopted in 1981. Development of a revised TG 452 was considered necessary in order to reflect recent developments in the field of animal welfare and regulatory requirements (1)(2)(3)(4). The updating of TG 452 has been carried out in parallel with revisions of the Test Guidelines 451, Carcinogenicity Studies and 453, Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity studies, with the objective of obtaining additional information from the animals used in the study and providing further detail on dose selection.
2. The majority of chronic toxicity studies are carried out in rodent species, and this Test Guideline is intended therefore to apply primarily to studies carried out in these species. Should such studies be required in non-rodent species, the principles and procedures outlined may also be applied, with appropriate modifications, as outlined in an OECD Guidance Document on the design and conduct of chronic toxicity and carcinogenicity studies (5).
3. The three main routes of administration used in chronic toxicity studies are oral, dermal and inhalation. The choice of the route of administration depends on the physical and chemical characteristics of the test substance and the predominant route of exposure of humans. Additional information on choice of route of exposure is provided in an OECD Guidance Document on the design and conduct of chronic toxicity and carcinogenicity studies (5).
4. This Guideline focuses on exposure via the oral route, the route most commonly used in chronic toxicity studies. While long-term chronic toxicity studies involving exposure via the dermal or inhalation routes may also be necessary for human health risk assessment and/or may be required under certain regulatory regimes, both routes of exposure involve considerable technical complexity. Such studies will need to be designed on a case-by-case basis, although the Guideline outlined here for the assessment and evaluation of chronic toxicity by oral administration could form the basis of a protocol for inhalation and/or dermal studies, with respect to recommendations for treatment periods, clinical and pathology parameters, etc. OECD Guidance is available on the administration of test substances by the inhalation (5)(6) and dermal routes (5). The updated Guidelines TG 412, Subacute inhalation toxicity: 28 day study (8) and TG 413, Subchronic Inhalation Toxicity: 90-Day Study (9), together with the associated OECD Guidance Document on acute inhalation toxicity testing (7), should be specifically consulted in the design of longer term studies involving exposure via the inhalation route.
5. The objectives of chronic toxicity studies covered by this test guideline include:
  - the identification of the hazardous properties of a chemical,
  - the identification of target organs,
  - characterisation of the dose:response relationship,
  - identification of a no-observed-adverse-effect level (NOAEL) or point of departure for establishment of a Benchmark Dose (BMD),
  - the prediction of chronic toxicity effects at human exposure levels,
  - provision of data to test hypotheses regarding mode of action (5).

## INITIAL CONSIDERATIONS

6. In the assessment and evaluation of the toxicological characteristics of a chemical, all available information on the test substance should be considered by the testing laboratory prior to conducting the study, in order to focus the design of the study to more efficiently test for chronic toxicity potential and to minimize animal usage. Information that will assist in the study design includes the identity, chemical structure, and physico-chemical properties of the test substance; any information on the mode of action; results of any *in vitro* or *in vivo* toxicity tests; anticipated use(s) and potential for human exposure; available (Q)SAR data and toxicological data on structurally-related substances; available toxicokinetic data (single dose and also repeat dose kinetics where available) and data derived from other repeated exposure studies. The determination of chronic toxicity may be carried out after initial information on toxicity has been obtained from repeated dose 28-day and/or 90-day toxicity tests. A phased testing approach to chronic toxicity testing should be considered as part of the overall assessment of the potential adverse health effects of a particular chemical (9)(10)(11)(12).
7. The chronic toxicity study provides information on the possible health hazards likely to arise from repeated exposure over a considerable part of the entire lifespan (in rodents). The study will provide information on the toxic effects of the substance, indicate target organs and the possibility of accumulation. It can also provide an estimate of the no-observed-adverse effect level which can be used for establishing safety criteria for human exposure. The need for careful clinical observations of the animals, so as to obtain as much information as possible, is also stressed.
8. In conducting a chronic toxicity study, the guiding principles and considerations outlined in the OECD Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation (13), in particular paragraph 62 thereof, should always be followed.
9. Detailed guidance on and discussion of the principles of dose selection for chronic toxicity and carcinogenicity studies can be found in an OECD Guidance Document on the design and conduct of chronic toxicity and carcinogenicity studies (5) as well as two International Life Sciences Institute publications (14)(15). The core dose selection strategy is dependent on the primary objective or objectives of the study (paragraph 5). In selecting appropriate dose levels, a balance has to be achieved between hazard screening on the one hand and characterisation of low-dose responses and their relevance on the other. This is particularly relevant in the situation where a combined chronic toxicity and carcinogenicity study (TG 453) is to be carried out (paragraph 10).
10. Consideration should be given to carrying out a combined chronic toxicity and carcinogenicity study (TG 453), rather than separate execution of a chronic toxicity study (TG 452) and carcinogenicity study (TG 451). Careful consideration should however be given to the principles of dose selection (paragraphs 9 and 20-24) when undertaking a combined chronic toxicity and carcinogenicity study (TG 453), and it is also recognised that separate studies may be required under certain regulatory frameworks.
11. Definitions used are given in the Annex.

## PRINCIPLE OF THE TEST

12. The test substance is administered daily in graduated doses to several groups of experimental animals for a period of 12 months, although longer or shorter durations may also be chosen (see paragraph

30). This duration is chosen to be sufficiently long to allow any effects of cumulative toxicity to become manifest, without the confounding effects of geriatric changes. Deviations from the exposure duration of 12 months must be justified, particularly in the case of shorter durations. The test substance is normally administered by the oral route although testing by the inhalation or dermal route may also be appropriate (paragraphs 3-4). The study design may also include one or more interim kills, e.g. at 3 and 6 months, and additional groups of animals may be included to accommodate this (see paragraph 18). During the period of administration the animals are observed closely for signs of toxicity. Animals which die or are killed during the test are necropsied and, at the conclusion of the test, surviving animals are also killed and necropsied.

## **DESCRIPTION OF THE METHOD**

### **Selection of animal species**

13. This Guideline primarily covers assessment and evaluation of chronic toxicity in rodents (see paragraph 2) although it is recognised that similar studies in non-rodents may be required under certain regulatory regimes. The choice of species must be justified. The design and conduct of chronic toxicity studies in other non-rodent species, when required, should be based on the principles outlined in this Guideline together with those in OECD TG 409, Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Non-Rodents. Additional information on choice of species and strain is provided in an OECD Guidance Document on the design and conduct of chronic toxicity and carcinogenicity studies (5).
14. In this Guideline, the preferred rodent species is the rat, although other rodent species, e.g., the mouse, may be used. Rats and mice have been preferred experimental models because of their relatively short life span, their widespread use in pharmacological and toxicological studies, their susceptibility to tumour induction, and the availability of sufficiently characterised strains. As a consequence of these characteristics, a large amount of information is available on their physiology and pathology. Young healthy adult animals of commonly used laboratory strains should be employed. The chronic toxicity study should be carried out in animals from the same strain and source as those used in preliminary toxicity study(ies) of shorter duration. The females should be nulliparous and non-pregnant.

### **Housing and feeding conditions**

15. Animals may be housed individually, or be caged in small groups of the same sex; individual housing should be considered only if scientifically justified (16)(17)(18). Cages should be arranged in such a way that possible effects due to cage placement are minimised. The temperature in the experimental animal room should be 22°C ( $\pm$  3°C). Although the relative humidity should be at least 30% and preferably not exceed 70% other than during room cleaning, the aim should be 50-60%. Lighting should be artificial, the sequence being 12 hours light, 12 hours dark. For feeding, conventional laboratory diets may be used with an unlimited supply of drinking water. The diet should meet all the nutritional requirements of the species tested and the content of dietary contaminants including but not limited to pesticide residues, persistent organic pollutants, phytoestrogens, heavy metals and mycotoxins, that might influence the outcome of the test, should be as low as possible. Analytical information on the nutrient and dietary contaminant levels should be generated periodically, at least at the beginning of the study and when there is a change in the batch used, and should be included in the final report. Analytical information on the drinking water used in the study should similarly be provided. The choice of diet may be influenced by the need to ensure a suitable admixture of a test substance and to meet the nutritional requirements of the animals when the test substance is administered by the dietary route.

## **Preparation of animals**

16. Healthy animals, which have been acclimated to laboratory conditions for at least 7 days and have not been subjected to previous experimental procedures, should be used. In the case of rodents, dosing of the animals should begin as soon as possible after weaning and acclimatisation and preferably before the animals are 8 weeks old. The test animals should be characterised as to species, strain, source, sex, weight and age. At the commencement of the study, the weight variation of animals used should be minimal and not exceed  $\pm 20\%$  of the mean weight of all the animals within the study, separately for each sex. Animals should be randomly assigned to the control and treatment groups. After randomisation, there should be no significant differences in mean body weights between groups within each sex. If there are statistically significant differences, then the randomisation step should be repeated, if possible. Each animal should be assigned a unique identification number, and permanently marked with this number by tattooing, microchip implant, or other suitable method.

## **PROCEDURE**

### **Number and sex of animals**

17. Both sexes should be used. A sufficient number of animals should be used so that at the end of the study enough animals in every group are available for thorough biological and statistical evaluation. Normally, at least 20 animals per sex per group should be used at each dose level. In studies involving mice, additional animals may be needed in each dose group to conduct all required haematological determinations. Depending on the aim of the study, it may be possible to increase the statistical power of the key estimates by allocating animals unequally to the different dose levels.

### **Provision for interim kills, satellite groups and sentinel animals**

18. The study may make provision for interim kills, e.g. at 6 months, to provide information on progression of toxicological changes and mechanistic information, if scientifically justified. Satellite groups may also be included to monitor the reversibility of any toxicological changes induced by the chemical under investigation; these will normally be restricted to the highest dose level of the study plus control. An additional group of sentinel animals (typically 5 animals per sex) may also be included for monitoring of disease status, if necessary, during the study (19). If interim kills or inclusion of satellite or sentinel groups are planned, the number of animals included in the study design should be increased by the number of animals scheduled to be killed before the completion of the study. These animals should normally undergo the same observations, including body weight, food/water consumption, haematological and clinical biochemistry measurements and pathological investigations as the animals in the chronic toxicity phase of the main study, although provision may also be made (in the interim kill groups) for measurements to be restricted to specific, key measures such as neurotoxicity or immunotoxicity.

### **Dose groups and dosage**

19. At least three dose levels and a concurrent control should be used, except where a limit test is conducted (see paragraph 26). Dose levels will generally be based on the results of shorter-term repeated dose or range finding studies and should take into account any existing toxicological and toxicokinetic data available for the test substance or related materials.
20. Unless limited by the physical-chemical nature or biological effects of the test substance, the highest dose level should be chosen to identify the principal target organs and toxic effects while avoiding

suffering, severe toxicity, morbidity, or death. While taking into account the factors outlined in paragraph 21 below, the highest dose level should be chosen to elicit evidence of toxicity, as evidenced by, for example, alterations in serum enzyme levels or depression of body weight gain (approximately 10 per cent).

21. However, dependent on the objectives of the study (see paragraph 5), a top dose lower than the dose providing evidence of toxicity may be chosen, e.g. if a dose elicits an adverse effect of concern that nonetheless has little impact on lifespan or body weight. The top dose should not exceed 1000 mg/kg body weight/day (limit dose, see paragraph 26).
22. Dose level spacing should be designed to demonstrate a dose:response and to establish a no-observed-adverse-effect level (NOAEL) or other intended outcome of the study, e.g. a BMD (see paragraph 24) at the lowest dose level. Factors that should be considered in the placement of lower doses include the expected slope of the dose–response curve, the doses at which important changes may occur in metabolism or mode of toxic action, where a threshold is expected, or where a point of departure for low-dose extrapolation is expected.
23. The dose level spacing selected will depend on the characteristics of the test substance, and cannot be prescribed in this Guideline, but two to four fold intervals are frequently optimal for setting the descending dose levels and addition of a fourth test group is often preferable to using very large intervals (e.g., more than a factor of about 6-10) between dosages. Further guidance on dose selection and dose level spacing is provided in an OECD Guidance Document on the design and conduct of chronic toxicity and carcinogenicity studies (5), but in general the use of factors greater than 10 should be avoided, and must be justified if used.
24. As outlined further in the OECD Guidance Document on the design and conduct of chronic toxicity and carcinogenicity studies (5), points to be considered in dose selection include:
  - known or suspected nonlinearities or inflection points in the dose–response;
  - pharmacokinetics, and dose ranges where metabolic induction, saturation, or nonlinearity between external and internal doses does or does not occur;
  - precursor lesions, markers of effect, or indicators of the operation of key underlying biological processes;
  - key (or suspected) aspects of mode of action, such as doses at which cytotoxicity begins to arise, hormone levels are perturbed, homeostatic mechanisms are overwhelmed, etc.;
  - regions of the dose–response curve where particularly robust estimation is required, e.g., in the range of the anticipated BMD or a suspected threshold;
  - consideration of anticipated human exposure levels.
25. The control group shall be an untreated group or a vehicle-control group if a vehicle is used in administering the test substance. Except for treatment with the test substance, animals in the control group should be handled in an identical manner to those in the test groups. If a vehicle is used, the control group shall receive the vehicle in the highest volume used among the dose groups. If a test substance is administered in the diet, and causes reduced dietary intake (of the order of 20% or more) due to the palatability of the diet, an additional pair-fed control group may be useful to allow for this.

26. If it can be anticipated, based on information from preliminary studies, that a test at one dose level, equivalent to at least 1000 mg/kg body weight/day, using the procedures described for this study, is unlikely to produce adverse effects and if toxicity would not be expected based upon data from structurally related substances, then a full study using three dose levels may not be considered necessary. The limit of 1000 mg/kg body weight/day applies except when human exposure indicates the need for a higher dose level to be used.

#### **Preparation of doses and administration of test substance**

27. The test substance is normally administered orally, by gavage or via the diet or drinking water. Additional information on routes and methods of administration is provided in an OECD Guidance Document on the design and conduct of chronic toxicity and carcinogenicity studies (5). The route and method of administration is dependent on the purpose of the study, the physical/chemical properties of the test substance, its bioavailability and the predominant route and method of exposure of humans. A rationale should be provided for the chosen route and method of administration. In the interests of animal welfare, oral gavage should normally be selected only for those agents for which this route and method of administration reasonably represent potential human exposure (e.g., pharmaceuticals). For dietary or environmental chemicals including pesticides, administration should be via the diet or drinking water.
28. Where necessary, the test substance is dissolved or suspended in a suitable vehicle. Consideration should be given to the following characteristics of the vehicle and other additives, as appropriate: effects on the absorption, distribution, metabolism, or retention of the test substance; effects on the chemical properties of the test substance which may alter its toxic characteristics; and effects on the food or water consumption or the nutritional status of the animals. It is recommended that, wherever possible, the use of an aqueous solution/suspension be considered first, followed by consideration of a solution/emulsion in oil (e.g., corn oil) and then by possible solution in other vehicles. For vehicles other than water, the toxic characteristics of the vehicle should be known. The stability of the test substance under the conditions of administration (e.g., diet) should be determined. The homogeneity of dosing solutions or diets containing the test article (as appropriate) should be confirmed analytically before the start of the study, and periodically (as appropriate) throughout the study, if the dose preparation procedure remains unchanged and if necessary, based on characteristics of the test article and the dosing vehicle.
29. For substances administered via the diet or drinking water it is important to ensure that the quantities of the test substance involved do not interfere with normal nutrition or water balance. In long-term toxicity studies using dietary administration, the concentration of the chemical in the feed should not normally exceed an upper limit of 5% of the total diet, in order to avoid nutritional imbalances. When the test substance is administered in the diet, either a constant dietary concentration (mg/kg or ppm) or a constant dose level in terms of the animal's body weight, calculated on a weekly basis, may be used; the alternative used should be specified.
30. In the case of oral or dermal administration, the animals are dosed with the test substance daily (seven days each week), normally for a period of 1 year (see also paragraph 31). Any other dosing regime, e.g., five days per week, needs to be justified. Dosing by the inhalation route is carried out for 6 hours per day, 5 days per week.
31. When the test substance is administered by gavage to the animals this should be done using a stomach tube or a suitable intubation cannula, at similar times each day. Normally a single dose will be administered once daily, where for example a compound is a local irritant, it may be possible to

maintain the daily dose-rate by administering it as a split dose (b.i.d). The maximum volume of liquid that can be administered at one time depends on the size of the test animal. Normally the volume should be kept as low as practical, and should not exceed 1 ml/100g body weight, except in the case of aqueous solutions where 2 ml/100g body weight may be used. Variability in test volume should be minimised by adjusting the concentration to ensure a constant volume at all dose levels. Potentially corrosive or irritant substances are the exception, and need to be diluted to avoid severe local effects. The pH of dosing solutions should normally lie in the range of 4 to 9.

### **Duration of study**

32. While this Test Guideline primarily is designed as a 12 month chronic toxicity study, the study design also allows for and can be applied to either shorter (e.g. 6 or 9 months) or longer (e.g., 18 or 24 months) duration studies, depending on the requirements of particular regulatory regimes or for specific mechanistic purposes. Deviations from the exposure duration of 12 months must be justified, particularly in the case of shorter durations. Satellite groups included to monitor the reversibility of any toxicological changes induced by the chemical under investigation should be maintained without dosing for a period not less than 4 weeks and not more than one third of the total study duration after cessation of exposure. Further guidance, including consideration of survival in the study, is provided in an OECD Guidance Document on the design and conduct of chronic toxicity and carcinogenicity studies (5).

### **OBSERVATIONS**

33. All animals should be checked for morbidity or mortality and for specific signs of toxicological relevance, in particular for neurofunctional and neurobehavioural signs (20), usually at the beginning and the end of each day. Additionally, animals should be checked at least once each weekend day and holiday. General clinical observations should be made at least once a day, preferably at the same time(s) each day, taking into consideration the peak period of anticipated effects after dosing. The clinical condition of the animals should be recorded.
34. Detailed clinical observations should be made on all animals at least once prior to the first exposure (to allow for within-subject comparisons), at the end of the first week of the study and monthly thereafter. The protocol for observations should be arranged such that variations between individual observers are minimised and independent of test group. These observations should be made outside the home cage, preferably in a standard arena and at similar times on each occasion. They should be carefully recorded, preferably using scoring systems, explicitly defined by the testing laboratory. Efforts should be made to ensure that variations in the observation conditions are minimal. Signs noted should include, but not be limited to, changes in skin, fur, eyes, mucous membranes, occurrence of secretions and excretions and autonomic activity (e.g., lacrimation, piloerection, pupil size, unusual respiratory pattern). Changes in gait, posture and response to handling as well as the presence of clonic or tonic movements, stereotypies (e.g., excessive grooming, repetitive circling) or bizarre behaviour (e.g., self-mutilation, walking backwards) should also be recorded (20).
35. Ophthalmological examination, using an ophthalmoscope or other suitable equipment, should be carried out on all animals prior to the first administration of the test substance. At the termination of the study, this examination should be preferably conducted in all animals but at least in the high dose and control groups. If treatment-related changes in the eyes are detected, all animals should be examined. If structural analysis or other information suggests ocular toxicity, then the frequency of ocular examination should be increased.



36. For chemicals where previous repeated dose 28-day and/or 90-day toxicity tests indicated the potential to cause neurotoxic effects, sensory reactivity to stimuli of different types (20) (e.g., auditory, visual and proprioceptive stimuli) (21), (22), (23), assessment of grip strength (24) and motor activity assessment (25) may optionally be conducted before commencement of the study and then at 3, 6, 9 and 12 months. Further details of the procedures that could be followed are given in the respective references. However, alternative procedures than those referenced could also be used.
37. For chemicals where previous repeated dose 28-day and/or 90-day toxicity tests indicated the potential to cause immunotoxic effects, further investigations of this endpoint may optionally be conducted at 12 months.

### **Body weight, food/water consumption and food efficiency**

38. All animals should be weighed at the start of treatment, at least once a week for the first 13 weeks, and at least monthly thereafter. Measurements of food consumption and food efficiency should be made at least weekly for the first 13 weeks and at least monthly thereafter. Water consumption should also be considered for studies in which drinking activity is altered, and should be measured at least weekly for the first 13 weeks and at least monthly thereafter, when the substance is administered in drinking water.

### **Haematology and clinical biochemistry**

39. In studies involving rodents, haematological examinations should be carried out in at least 10 male and 10 female animals per group, at 3, 6, and 12 months, using the same animals throughout. In mice, satellite animals may be required in order to conduct all required haematological determinations (see paragraph 17). In non-rodent studies, samples will be taken from smaller numbers of animals (e.g. 4 animals per sex and per group in dog studies). Measurements at 3 months need not be conducted if no effect was seen on haematological parameters in a previous 90 day study carried out at comparable dose levels. Samples should be collected at the end of the designated test period, namely from animals on study at 3 and 6 months, and at 12 months just prior to or as part of the procedure for killing the animals. Blood samples should be taken from a named site, for example by cardiac puncture or retro-orbital sinus, and stored, if applicable, under appropriate conditions. The following list of parameters should be investigated (26): Total and differential leukocyte count, erythrocyte count, platelet count, haemoglobin concentration, haematocrit (packed cell volume), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC), prothrombin time, and activated partial thromboplastin time. In addition Heinz bodies or other atypical erythrocyte morphology and methaemoglobin should be investigated if there is any indication of anaemia or other haematopoietic disorders. If the chemical has an effect on the haematopoietic system, reticulocyte counts and bone marrow cytology may also be indicated, although these need not be routinely conducted.
40. Clinical biochemistry determinations to investigate major toxic effects in tissues and, specifically, effects on kidney and liver, should be performed on blood samples obtained from at least 10 male and 10 female animals per group at the same time intervals as specified for the haematological investigations, using the same animals throughout. In mice, satellite animals may be required in order to conduct all required clinical biochemistry determinations. Measurements at 3 months need not be conducted if no effect was seen on clinical biochemistry parameters in a previous 90 day study carried out at comparable dose levels. Overnight fasting of the animals (with the exception of mice) prior to blood sampling is recommended. The following list of parameters should be investigated (26): glucose, urea (urea nitrogen), creatinine, total protein, albumin, calcium, sodium, potassium, total

cholesterol, at least two appropriate tests for hepatocellular evaluation (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, glutamate dehydrogenase, total bile acids)(27), and at least two appropriate tests for hepatobiliary evaluation (alkaline phosphatase, gamma glutamyl transferase, 5'-nucleotidase, total bilirubin, total bile acids)(27). Other clinical chemistry parameters such as fasting triglycerides, specific hormones and cholinesterase may be measured as appropriate, depending on the toxicity of the substance. Overall, there is a need for a flexible approach, depending on the observed and/or expected effect from a given substance.

41. Urinalysis determinations should be performed on at least 10 male and 10 female animals per group on samples collected at the same intervals as for haematology and clinical chemistry. Measurements at 3 months need not be conducted if no effect was seen on urinalysis in a previous 90 day study carried out at comparable dose levels. The following list of parameters was included in a recent expert recommendation on clinical pathology studies (26): appearance, volume, osmolality or specific gravity, pH, total protein, and glucose. Other determinations include ketone, urobilinogen, bilirubin, and occult blood. Further parameters may be employed where necessary to extend the investigation of observed effect(s).
42. It is generally considered that baseline haematological and clinical biochemistry variables need not be determined before treatment (26). However, if historical baseline data (see paragraph 47) are inadequate, consideration should be given to generating such data.

## **Pathology**

### **Gross necropsy**

43. All animals in the study shall normally be subjected to a full, detailed gross necropsy which includes careful examination of the external surface of the body, all orifices, and the cranial, thoracic and abdominal cavities and their contents. However provision may also be made (in the interim kill or satellite groups) for measurements to be restricted to specific, key measures such as neurotoxicity or immunotoxicity (see paragraph 18). These animals need not be subjected to necropsy and the subsequent procedures described in the following paragraphs. Sentinel animals may require necropsy on a case-by-case basis, at the discretion of the study director.
44. Organ weights should be collected from all animals, other than those excluded by the latter part of paragraph 42. The adrenals, brain, epididymides, heart, kidneys, liver, ovaries, spleen, testes, thyroid (weighed post-fixation, with parathyroids), and uterus of all animals (apart from those found moribund and/or intercurrently killed) should be trimmed of any adherent tissue, as appropriate, and their wet weight taken as soon as possible after dissection to prevent drying. In the case of paired organs, e.g., kidney, adrenal, both organs should be weighed separately. In a study using mice, weighing of the adrenal glands is optional.
45. The following tissues should be preserved in the most appropriate fixation medium for both the type of tissue and the intended subsequent histopathological examination (27): all gross lesions, adrenal gland, aorta, brain (including sections of cerebrum, cerebellum, and medulla/pons), caecum, cervix, coagulating gland, colon, duodenum, epididymis, eye (including retina), [femur with joint] gall bladder (for species other than rat), Harderian gland, heart, ileum, jejunum, kidney, lacrimal gland (exorbital), liver, lung, lymph nodes (both superficial and deep), female mammary gland, [nasal tissue], oesophagus, [olfactory bulb], ovary, pancreas, parathyroid gland, peripheral nerve, pituitary, prostate, [rectum], salivary gland, seminal vesicle, skeletal muscle, skin, spinal cord (at three levels: cervical, mid-thoracic, and lumbar), spleen, [sternum], stomach (forestomach, glandular stomach), [teeth], testis, thymus, thyroid gland, [tongue], trachea, urinary bladder, uterus (including cervix),

[ureter], [urethra], vagina, and a section of bone marrow and/or a fresh bone marrow aspirate). Tissues in square brackets are optional. In the case of paired organs, e.g., kidney, adrenal, both organs should be preserved. The clinical and other findings may suggest the need to examine additional tissues. Also any organs considered likely to be target organs based on the known properties of the test substance should be preserved. In studies involving the dermal route of administration, the list of organs as set out for the oral route should be preserved, and specific sampling and preservation of the skin from the site of application is essential. In inhalation studies, the list of preserved and examined tissues from the respiratory tract should follow the recommendations of Test Guideline 412. For other organs/tissues (and in addition to the specifically preserved tissues from the respiratory tract) the list of organs as set out for the oral route has to be examined.

## Histopathology

46. Guidance is available on best practices in the conduct of toxicological pathology studies (27). The minimum histopathological examinations should be:
- all tissues from the high dose and control groups;
  - all tissues from animals dying or killed during the study;
  - all tissues showing macroscopic abnormalities;
  - target tissues, or tissues which showed treatment-related changes in the high dose group, from all animals in all other dose groups;
  - in the case of paired organs, e.g., kidney, adrenal, both organs should be examined.
47. Individual animal data should be provided for all parameters evaluated. Additionally, all data should be summarised in tabular form showing for each test group the number of animals at the start of the test, the number of animals found dead during the test or killed for humane reasons and the time of any death or humane kill, the number showing signs of toxicity, a description of the signs of toxicity observed, including time of onset, duration, and severity of any toxic effects, the number of animals showing lesions, the type of lesions and the percentage of animals displaying each type of lesion.
48. In addition to data obtained from the concurrent controls used in the study, the use of historical control data may be valuable in the interpretation of the results of the study. This is particularly the case where there are indications that the data provided by the concurrent controls are substantially out of line compared to recent data from control animals from the same test facility colony. Historical control data should be used only if concurrent controls appear to be significantly different; the priority should be placed on use of concurrent control over historical control data. Historical control data, if evaluated, should be submitted from the same laboratory, strain, species and specific ranges should be provided. The historical control data should be separated by sex and malignant and benign lesions should be presented separate and combined, where appropriate, and preferably by individual study. The use of historical data should be restricted to data generated during the five years preceding the study in question.
49. When applicable, numerical results should be evaluated by an appropriate and generally acceptable statistical method. The statistical methods and the data to be analysed should be selected during the design of the study. Selection should make provision for survival adjustments, if needed.

## TEST REPORT

49. The test report should include the following information:

- Test substance:

- physical nature, purity, and physicochemical properties;
  - identification data;
  - source of substance;
  - batch number
- Vehicle (if appropriate):
  - justification for choice of vehicle (if other than water).
- Test animals:
  - species/strain used and justification for choice made;
  - number, age, and sex of animals at start of test;
  - source, housing conditions, diet, etc.;
  - individual weights of animals at the start of the test.
- Test conditions:
  - rationale for route of administration and dose selection;
  - when applicable, the statistical methods used to analyse the data;
  - details of test substance formulation/diet preparation, achieved concentration, stability and homogeneity of the preparation;
  - route of administration and details of the administration of the test substance;
  - for inhalation studies, whether nose only or whole body;
  - actual doses (mg/kg body weight/day), and conversion factor from diet/drinking water test substance concentration (mg/kg or ppm) to the actual dose, if applicable;
  - details of food and water quality.
- Results:
  - survival data;
  - body weight/body weight changes;
  - food consumption, calculations of food efficiency, if made, and water consumption if applicable;
  - toxic response data by sex and dose level, including signs of toxicity;
  - nature, incidence (and, if scored, severity), and duration of clinical observations ((whether transitory or permanent);
  - ophthalmological examination;
  - haematological tests;
  - clinical biochemistry tests;
  - urinalysis tests;
  - outcome of any investigations of neurotoxicity or immunotoxicity
  - terminal body weight;
  - organ weights (and their ratios, if applicable);
  - necropsy findings;
  - a detailed description of all treatment-related histopathological findings;
  - absorption data if available;
- Statistical treatment of results, where appropriate.
  - body weights,
  - organ weights,
  - feed consumption (or water consumption) and food efficiency.

- Discussion of results including:
  - Dose:response relationships
  - Consideration of any mode of action information
  - Discussion of any modelling approaches
  - Historical control data
  - Relevance for humans
- Conclusions

## **LITERATURE**

1. OECD (Rome, 1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing.
2. Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32, 163-208.
3. Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.
4. Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206, 437-445.
5. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. No. xx. Guidance Document on the design and conduct of chronic toxicity and carcinogenicity studies [alternate: Guidance Document on the selection of doses for use in chronic toxicity and carcinogenicity studies].
6. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. No. 39. Draft Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Version 9, March 2008.
7. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. TG 412, Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study.
8. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. TG 413, Subchronic Inhalation Toxicity: 90-Day Study.
9. Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36, 1-7.
10. Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36, 9-35.
11. Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36, 37-68.

12. Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36, 69-98.
13. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. No. 19. Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation (2000).
14. Rhomberg, LR, Baetcke, K, Blancato, J, Bus, J, Cohen, S, Conolly, R, Dixit R, Doe, J, Ekelman, K, Fenner-Crisp, P, Harvey, P, Hattis, D, Jacobs, A, Jacobson-Kram, D, Lewandowski, T, Liteplo, R, Pelkonen, O, Rice, J, Somers, D, Turturro, A, West, W, Olin, S. Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* [37](#) (9) 729 - 837 (2007).
15. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
16. EEC Council Directive 86/609/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Official Journal, 29, L358, 18th December 1986.
17. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
18. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.. [http://www.gv-solas.de/publ/heft1\\_1988.pdf](http://www.gv-solas.de/publ/heft1_1988.pdf)
19. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems. [http://www.gv-solas.de/auss/hyg/hyg-p7\\_e.html](http://www.gv-solas.de/auss/hyg/hyg-p7_e.html)
20. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
21. Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999-1003.
22. Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, 691-704.
23. Moser, V.C., McDaniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.
24. Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.

25. Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, 599-609.
26. Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.*, 29: 198-201.
27. EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006)
28. Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32, 126-131.

## ANNEX

### DEFINITIONS

**Dose:** is the amount of test substance administered. Dose is expressed as weight (g, mg) or as weight of test substance per unit weight of test animal (e.g., mg/kg), or as constant dietary concentrations (ppm).

**Dosage:** is a general term comprising of dose, its frequency and the duration of dosing.

**NOAEL:** is the abbreviation for no-observed-adverse-effect level and is the highest dose level where no adverse treatment-related findings are observed.

*To be expanded as appropriate*